



Геном и его регуляция

УДК 575.113

ГЕНЫ РИБОСОМАЛЬНЫХ РНК У КРАСАВКИ, *ATROPA BELLADONNA*

Н. В. Борисюк, Г. П. Мпрошниченко

Организация генов рибосомальных РНК (рРНК) покрытосеменных растений к настоящему времени изучена значительно меньше, чем у других эукариот [1—3]. У всех эукариот неоднократно были отмечены меж- и внутривидовые различия в длине и структуре повторяющихся последовательностей генома, включающих в себя гены рРНК [1]. Поэтому сравнение таких последовательностей и их отдельных участков оказалось полезным для установления филогенетических связей между отдельными группами высших растений [4—7]. На существовании межвидовых различий этих последовательностей (рДНК) основано и использование их рестрикционного анализа при изучении геномов парасексуальных (соматических) гибридов, получаемых слиянием протопластов высших растений [8]. Ранее этот подход был применен нами к генетическому материалу соматического гибрида между арабидопсисом и турнепсом [9].

В настоящей работе более детально исследована организация рибосомальных повторов красавки, *Atropa belladonna* (семейство пасленовых), послужившей одной из родительских форм для получения межродового соматического гибрида *A. belladonna* × *Nicotiana glauca* [10].

ДНК выделяли из грубоочищенной ядерной фракции, полученной из листьев [11]. Окончательную очистку осуществляли двукратным центрифугированием в градиенте плотности CsCl с бромистым этидием [12]. ДНК гидролизовали рестриктазами *EcoRI* и *EcoRV*, фрагменты разделяли электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле и переносили на нитроцеллюлозные фильтры [13]. В качестве маркера для определения молекулярной массы полученных фрагментов использовали ДНК фага λ, гидролизованную рестриктазой *EcoRI*. ДНК красавки на нитроцеллюлозных фильтрах гибридизовали с 18S и 25S рРНК кукурузы, а также с плазмидой *pUC222*¹ (плазида любезно предоставлена И. Фодором и В. Колошей, Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, Пущино), содержащей 3'-концевой фрагмент 25S рДНК лимона длиной ~500 пар нуклеотидов (п. н.). 18S и 25S рРНК получали двукратным центрифугированием суммарной рРНК в градиенте плотности сахарозы и метили по 5'-концу в присутствии γ-³²P-АТФ и T4-полинуклеотидкиназы [13]. Плазмиду, несущую фрагмент рДНК лимона, метили в реакции ник-трансляции [13]. После гибридизации распределение радиоактивной метки на фильтре изучали методом автордиографии.

Результаты гибридизации гидролизатов ДНК *A. belladonna* с 18S и 25S рРНК, а также с плазмидой *pUC222* представлены на рис. 1. Видно, что после расщепления рестриктазой *EcoRI* ядерной ДНК *A. belladonna* с ³²P-18S рРНК гибридизуются, в основном, фрагменты длиной 6,3 и 5,5 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.) (рис. 1, а), а с ³²P-25S рРНК — фрагменты длиной 6,3—5,5; 3,9 и 2,6—2,5 т. п. н.

(рис. 1, б). Это позволяет сделать вывод о наличии в рибосомальных повторах красавки двух участков узнавания рестриктазы *EcoRI*, локализованных в генах 25S и 18S рРНК. Как следует из рис. 1, а, б, в результате расщепления рибосомального повтора по этим участкам образуются фрагменты длиной 6,3—5,5 т. п. н., включающие последовательности генов 18S и 25S рРНК, а также фрагменты меньшей длины (3,9 и 2,6—2,5 т. п. н.), содержащие последовательности гена 25S рРНК и внутреннего транскрибируемого спейсера (ТС).

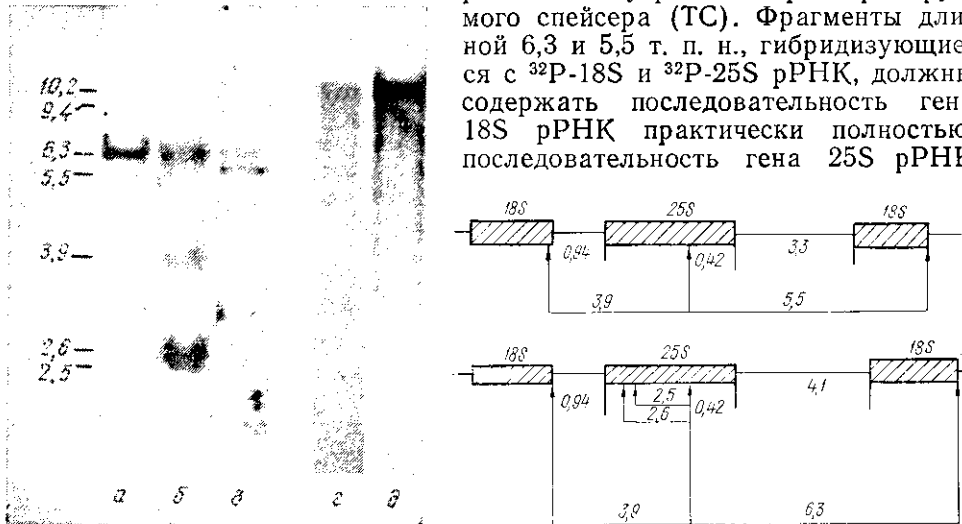


Рис. 1. Гибридизация ДНК *A. belladonna* после расщепления рестриктазами с ^{32}P -зондами: а — *EcoRI*, ^{32}P -18S рРНК; б — *EcoRI*, ^{32}P -25S рРНК; в — *EcoRI*, ^{32}P -*pUC222*; г — *EcoRV*, ^{32}P -18S рРНК; д — *EcoRV*, ^{32}P -*pUC222*

Fig. 1. Autoradiograph of restriction nuclease digests of total nuclear DNA of *Atropa belladonna* hybridized to ^{32}P -probes: а — *EcoRI*, ^{32}P -18S rRNA; б — *EcoRI*, ^{32}P -25S rRNA; в — *EcoRI*, ^{32}P -*pUC222* DNA; г — *EcoRV*, ^{32}P -18S rRNA; д — *EcoRV*, ^{32}P -*pUC222* DNA

Рис. 2. Строение двух рибосомальных повторов красавки по данным гидролиза рестриктазами *EcoRI* и *EcoRV*. Заштрихованные прямоугольники — гены 18S и 25S рРНК. Стрелками обозначены участки узнавания рестриктазы *EcoRI*. Размеры фрагментов даны в т. п. н.

Fig. 2. Preliminary physical maps of two *A. belladonna* rDNA repeating units. The hatched boxes represent the genes for 18S and 25S rRNAs. The arrows indicate the *EcoRI* cleavage sites. Numerals represent the fragment lengths (in kilobases)

(полностью или частично), а также полную последовательность внешнего нетранскрибируемого спейсера (НТС). О том, что в состав этих фрагментов входит только часть последовательности, кодирующей 25S рРНК, свидетельствует гибридизация фрагментов длиной 6,3 и 5,5 т. п. н. с плазмидой *pUC222*, которая содержит фрагмент гена 25S рРНК лимона от 3'-конца кодирующей последовательности до *EcoRI*-сайта длиной 420 нуклеотидов (рис. 1, в); фрагмент длиной 3,9 т. п. н. гибридизуется только с 25S рРНК (рис. 1, б), т. е. может содержать ген 25S рРНК (полностью или частично) и последовательность ТС (либо ее часть). Отсутствие гибридизации этого фрагмента с плазмидой *pUC222* свидетельствует о наличии в нем только части последовательностей, кодирующих 25S рРНК (начиная с 420-го положения от 3'-конца соответствующего гена). Если предположить, что ТС входит целиком во фрагмент длиной 3,9 т. п. н., то рассчитанная на основании полученных данных длина рибосомальных повторов красавки составит 9,4 или 10,2 т. п. н. Это подтверждается результатами гибридизации 18S рРНК с ДНК *A. belladonna* после гидролиза рестриктазой *EcoRV* (рис. 1, г). На основании приведенных результатов была построена предварительная рестриктная карта рибосомальных повторов ДНК *A. belladonna* (рис. 2). Исходя из полученных данных можно прийти к заключению

о гетерогенности повторяющихся единиц в рДНК красавки: длина двух найденных нами у этого растения типов рибосомальных повторов различается на 800 нуклеотидов. Тот факт, что два гетерогенных по длине фрагмента гибридизуются как с 18S, так и с 25S рРНК, позволяет сделать вывод о том, что наблюдаемые различия обусловлены гетерогенностью по длине НТС, а не наличием вставок в последовательностях, кодирующих 25S рРНК. В настоящее время полностью определены последовательности, кодирующие 17S рРНК риса [4] и 26S рРНК лимона [7]. Длина этих последовательностей 1812 и 3377 п. н. соответственно. Исходя из этих данных и опираясь на общепринятые представления о консерватизме рибосомальных генов у эукариот, мы использовали полученные результаты для расчета спейсерных последовательностей в рибосомальных повторах *A. belladonna* (рис. 2). Рассчитанная для внешнего НТС длина составляет 4100—3300 п. н., а для внутреннего ТС ~ 940 п. н. Близкие величины были получены для пшеницы, редиса и риса [5, 14, 15]. Проведенные расчеты позволили также локализовать на рестриктной карте рибосомального повтора *A. belladonna* участки узнавания рестриктазы *EcoRI*, расщепление по которым дает фрагменты длиной 2,5—2,6 т. п. н., гибридизующиеся с 25S рРНК (рис. 1, б). Эти участки расположены на расстоянии 360 и 460 нуклеотидов от 5'-конца последовательности, кодирующей 25S рРНК (рис. 2).

Таким образом, *A. belladonna* содержит рибосомальные повторы размером 9,4 и 10,2 т. п. н., включающие участки узнавания рестриктазы *EcoRI* в последовательностях, кодирующих 18S и 25S рРНК; рестриктаза *EcoRV* имеет в изученных рибосомальных повторах только один участок узнавания.

Исследованная в настоящей работе красавка, *A. belladonna*, является первым представителем растений семейства пасленовых, для которого определена длина повторяющихся полинуклеотидных последовательностей, кодирующих рРНК. Для уточнения полученной рестриктной карты рибосомального повтора *A. belladonna* необходим гидролиз рДНК другими рестриктазами. В настоящее время проводится также детальный анализ рДНК табака, *N. chinensis*, послужившего другой родительской формой для получения соматического гибрида *A. belladonna*, а также изучение рибосомальных повторов в геноме этого гибрида.

STRUCTURAL ORGANIZATION OF RIBOSOMAL DNA IN *Atropa belladonna*

N. V. Borisyuk, G. P. Miroshnichenko

N. G. Kholodny Institute of Botany,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
A. N. Bielezersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
Moscow State University, Moscow

Summary

The rDNA structure of *A. belladonna* was examined by Southern blot-hybridization of *EcoRI*- and *EcoRV*-digests of total nuclear DNA using the maize ³²P-rRNA-probes and the ³²P-*pUC222* plasmid containing the sequence coding for the 3' end of 25S rRNA and a fragment of non-transcribing spacer from the lemon rDNA. The possible physical maps were tentatively constructed for *EcoRI* and *EcoRV* cleavage sites around the 18S and 25S rRNA genes. Two size classes of the repeating units of 9.4 and 10.2 kilobases were found containing the *EcoRI* cleavage sites in the coding regions for 18S and 25S rRNAs. Both the repeating units found contained only one *EcoRV* cleavage site.

1. Ильин Ю. В. Повторяющиеся гены эукариот // Молекуляр. биология.— 1982.—16, № 2.— С. 229—257
2. Ingle J., Timmis J. N., Sinclair J. The relationship between satellite DNA, ribosomal gene redundancy and genome size in plants // Plant physiol.—1975.—55, N 3.— P. 496—501.

3. Takaiwa F., Oono K., Sugiura M. The complete nucleotide sequence of a rice 17S rRNA gene // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 13.—P. 5441—5448.
4. Yakura K., Kato A., Tanifuji S. Structural organization of ribosomal DNA in four *Trillium* species and *Paris verticillata* // Plant and Cell Physiol.—1983.—24, N 7.—P. 1231—1240.
5. Gerlach W. L., Bedbrook J. R. Cloning and characterization of ribosomal DNA from wheat and barley // Nucl. Acids Res.—1979.—7, N 7.—P. 1869—1885.
6. Appels R., Dvorak J. The wheat ribosomal DNA spacer region: its structure and variation in populations and among species // Theor. and Appl. Genet.—1982.—63, N 4.—P. 337—348.
7. Kolosha V. O., Kryukov V. M., Fodor I. Sequence analysis of Citrus limon DNA coding for 26S rRNA // FEBS Lett.—1986.—197, N 1, 2.—P. 89—92.
8. Brar D. S., Ono M., Kobayashi S. Analysis of chromosomes and ribosomal RNA genes in parasexual hybrids of *Nicotiana* // Protoplasma.—1984.—121, N 3.—P. 228—231.
9. Мирошниченко Г. П., Волков Р. А., Борисюк Н. В. Структура геномов турнепса, арабидопсиса и их соматического гибрида // Биохимия.—1986.—51, № 1.—С. 84—94.
10. Intertribal hybrid cell lines of *Atropa belladonna* × *Nicotiana chinensis* obtained by cloning of individual protoplast fusion products / Y. Y. Gleba, V. P. Momot, N. N. Cherer, M. V. Scarszhynskaya // Theor. and Appl. Genet.—1982.—62, N 1.—P. 75—79.
11. Беридзе Т. Г. Ядерные сателлиты ДНК рода *Brassica* L. // Молекуляр. биология.—1976.—10, № 3.—С. 538—543.
12. Rawson J. R. Y., Thomas K., Clegg M. T. Purification of total cellular DNA from a single plant // Biochem. Genet.—1982.—20, N 3/4.—P. 117—122.
13. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—344 с.
14. Les gènes nucléaires codant pour les ARN ribosomiques de *Radix* / M. Delseny, L. Aspart, R. Coore, A. Got // Physiol. végét.—1980.—18, N 2.—P. 373—388.
15. Takaiwa F., Oono K., Sugiura M. Nucleotide sequence of the 17—25S spacer region from rice rDNA // Plant Mol. Biol.—1985.—4, N 2.—P. 355—364.

Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев
МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 24.07.86