



УДК 579.254

КЛОН *Dmλ5*, СОДЕРЖАЩИЙ ВСТАВКУ I ТИПА РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ *Drosophila melanogaster*, И ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКА

Р. П. Вашикидзе, Н. З. Мжавия

У *D. melanogaster* более половины всех повторов рибосомных генов содержат вставочные повторяющиеся последовательности в гене 28S рРНК, среди которых различают два типа, отличающихся по длине и нуклеотидному составу [1]. Вставочные последовательности I типа образуют семейство более чем из 100 родственных последовательностей ДНК; II типа — локализованы в хромоцентрах X и Y хромосом и образуют два основных класса размером 1,4 и 3,5 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.). Основной повторяющийся элемент I типа имеет длину 5 т. п. н., остальные члены этого семейства — от 0,5 до 1,0 т. п. н. [2]. Вставки I типа, кроме хромоцентра X-хромосомы, встречаются и в других участках генома [3]. Авторы работы [4] ранее клонировали последовательности, соседствующие с внеядрышковыми последовательностями вставок I типа, и показали, что они по крайней мере в некоторых случаях представляют собой мобильные генетические элементы (МГЭ). Для отбора этих последовательностей использовали большой проксимальный фрагмент вставки I типа (рисунок, а, клон *Dmλ21*) [4]. Нами получен и описан клон *Dmλ89*, содержащий фрагмент вставки I типа, который имел внеядрышковую локализацию. Клон содержит последовательность, гомологичную дистальному концу вставки I типа (рисунок, а, клон *B0,9*), и два соседствующих фрагмента, имеющих в геноме нестабильную локализацию [5]. Клон *Dmλ89* (рисунок, б) содержит небольшой фрагмент (2,5 т. п. н.) геномной ДНК *D. melanogaster* и, по-видимому, представляет собой только часть МГЭ.

Целью данной работы являлись клонирование и характеристика фрагмента ДНК *D. melanogaster* длиной не более 10 т. п. н., содержащего все типы последовательностей ДНК клона *Dmλ89*. Методы, использованные в работе, описаны ранее [6—8].

Клонирование последовательности ДНК, содержащей вставку I типа рибосомных генов и имеющей внеядрышковую локализацию, проводили следующим образом.

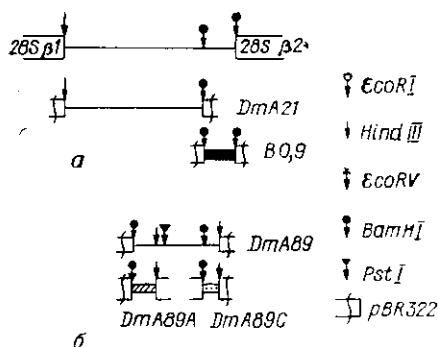
На первом этапе ³²P-ДНК клона *B0,9* гибридизовали с геномным банком *D. melanogaster* в фage *Charon 4A* (любезно предоставленным Т. Маннатисом). Средняя длина геномных фрагментов ДНК *D. melanogaster* в библиотеке *Charon 4A* равна 15 т. п. н. После гибридизации было отобрано около 20 клонов, дающих положительные сигналы. Для отбора клонов, содержащих ДНК с фрагментом вставки I типа (*B0,9*), не являющейся частью рибосомного повтора, проводилась гибридизация ДНК этих клонов с клонами *Dmλ89A* и *Dmλ89C*. Таким образом, было отобрано три клона *Dmλ1*, *Dmλ3* и *Dmλ5*, ДНК которых гибридизовалась с последовательностью ДНК клонов *Dmλ89A* и *Dmλ89C* (не обладающей ядрышковой локализацией) и, следовательно, также не локализовалась в ядрышке [5]. Клон *Dmλ5*, содержащий фрагмент ДНК длиной 12,5 т. п. н., был изучен более детально. При обработке ДНК клона *Dmλ5* рестриктазой *HindIII* образуются четыре фрагмента ДНК вставки. *HindIII*-фрагменты были субклонированы в соответствующий сайт вектора *pBR322*. Отобранные рекомбинантные клоны обозначены *m8*, *m5*, *H17* (рисунок, в). Рестрикционные карты ДНК клонов строили, используя рестриктазы *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV* в их сочетании. Размеры фрагментов ДНК, образующихся при рестрикции ДНК клона *Dmλ5* этими рестриктазами, сопоставляли с размерами фрагментов, образующихся при рестрикции ДНК кло-

нов *m8*, *m5*, и *H17*. Таким образом, оказалось возможным однозначное расположение сайтов рестрикции и построение рестрикционной карты ДНК клона *Dmλ5*.

На основании рестрикционной карты была субклонирована ДНК клонов *m8* и *m5*. Субклон *m8.1* получен рестрикцией ДНК клона *m8* рестриктазой *BamHI* и последующим лигированием. Для получения субклона *m8.2* ДНК клона *m8* обрабатывали рестриктазами *BamHI* и *EcoRI* и лигировали с ДНК *pBR322*. Для получения субклонов *m5.1* и *m5.5* ДНК клона *m5* обрабатывали рестриктазами *BamHI* и *EcoRI* соответственно и лигировали. Обработкой ДНК субклона *m5.5* рестриктазами *EcoRV* и *BamHI* и последующим лигированием получали субклоны *m10* и *m9* соответственно.

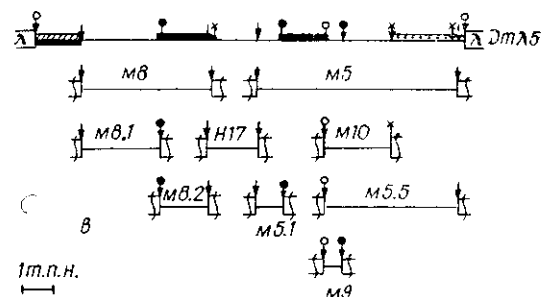
Для локализации фрагментов, гомологичных *DmA89A*, *DmA89C* и *B0,9* последовательностям, ДНК клона *Dmλ5* расщепляли рестриктазами *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV* и их комбинациями. Фрагменты ДНК фракционировали в агарозном геле, переносили на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с ³²P-ДНК *DmA89A*, *DmA89C* и *B0,9* последовательно. Для локализации проксимальной части вставки I типа рибосомных генов в качестве зонда использовали ДНК клона *DmA21*.

Как видно из рисунка, в,



Фрагмент гена 28S рРНК *D. melanogaster* с длинной вставкой I типа (а) и рестрикционные карты ДНК клонов *DmA89* (б) и *Dmλ5* (в). Внизу показаны субклонированные фрагменты

Fragment of *D. melanogaster* 28S rRNA gene with insertion of type I (a) and restriction map of DNA of *DmA89* (b) and *Dmλ5* clones (c). Below are the subcloned fragments



EcoRI-HindIII-фрагмент длиной 1,3 т. п. н. содержит последовательность, гомологичную ДНК клонов *DmA89A* и *B0,9*. Дистальная часть вставки I типа встречается также в *BamHI-EcoRI*- и *HindIII-BamHI*-фрагментах, имеющих длину 1,25 и 1,30 т. п. н. соответственно. Последовательность, гомологичная *DmA89C*, локализована в *EcoRI*-фрагменте длиной 1,7 т. п. н. Проксимальная часть вставки I типа (клона *DmA21*) не входит в состав ДНК клона *Dmλ5*.

Для выяснения вопроса, является ли ДНК клона *Dmλ5* целиком повторяющимся элементом или представляет собой скопление повторяющихся последовательностей, была определена повторяемость отдельных участков ДНК клона *Dmλ5*. Для изучения повторяемости фрагмента ДНК использовали метод дот-гибридизации. Геномную ДНК *D. melanogaster* (2 мкг) наносили на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с ³²P-ДНК субклонов *m8.1*, *m8.2*, *m5.1*, *m9*, *m10*, а также с ДНК клонов, содержащих ген актина, ген белка теплового шока, повторяющуюся последовательность ДНК гистонов, фрагмент гена 28S рРНК и МДГ1 [6], повторяемость которых точно установлена. Результаты гибридизации показали, что фрагменты ДНК, соседствующие с последовательностями, гомологичными *DmA89A*, *DmA89C* и *B0,9*, уникальны. Повторяемость также оценивали гибридизацией по Саузерну. Геномную ДНК *D. melanogaster* расщепляли эндонуклеазой *HindIII*, фракционировали в 1%-ном агарозном геле, переносили на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с ³²P-ДНК субклонов. Опыты по дот-гибридизации и гибридизации по Саузерну дали одинаковые результаты. Повторяемость субклонированных фрагментов *m8.1*, *H17*, *m5.1*, *m9*, *m10* варьировала от 1 до 5 копий в геноме. ДНК клона *m8.2*, содержащая последовательность, гомологичную дистальной части вставки I типа рибосомных генов, с обеих сторон фланкирована

уникальными последовательностями. Это указывает на то, что фрагмент вставки I типа рибосомных генов не входит в состав МГЭ.

Однако в *EcoRI-HindIII*-фрагменте длиной 1,3 т.п.н. (рисунок, в) последовательность, гомологичная дистальной части вставки I типа рибосомных генов, соседствует с генетическим элементом, имеющим в геноме нестабильную локализацию. Была изучена транскрибируемость ДНК субклонов *m8.1* и *H17*, которая фланкирует ДНК клона *m8.2*, содержащую фрагмент, гомологичный дистальной части вставки I типа. Суммарную РНК *D. melanogaster* фракционировали в 1,4 %-ном агарозном геле, содержащем 2,2 М формальдегид, переносили на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с ³²P-ДНК субклонов *m8.1* и *H17*. О транскрипционной активности судили по интенсивности гибридизации на автордиограммах. В качестве положительного контроля были использованы клоны гистонового и актинового генов, а в качестве отрицательного — клоны, содержащие последовательности сателлитной ДНК и ген теплового шока. Было показано, что последовательность ДНК субклонов, прилегающая к фрагменту вставки I типа, не транскрибируется.

Таким образом, фрагменты вставки I типа могут входить как в состав МГЭ [4, 5], так и встречаться в соседстве с уникальными, нетранскрибируемыми последовательностями ДНК вне рибосомного повтора.

CLONING AND CHARACTERIZATION OF *DMA5* CLONE CONTAINING TYPE I INSERTIONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* RIBOSOMAL GENES

R. P. Vashakidze, N. Z. Mzhavia

Institute of Molecular Biology and Biological Physics,
Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi

Summary

The 12.5 kb sequence of DNA containing distal fragment of type I ribosomal repeat insertion and repeating elements of A89 clone from *D. melanogaster* genomic library has been cloned. It has been shown that fragment of type I insertion in the cloned sequence may be flanked both by the unique nontranscribed sequences and a mobile genetic element.

1. Dawid I. B., Wellaner P. K., Long E. O. Ribosomal DNA in *D. melanogaster*. 1. Isolation and characterization of cloned fragments // J. Mol. Biol.—1978.—126, N 4.— P. 749—768.
2. Tartof K. D., Dawid I. B. Similarities and difference in the structure of X and Y chromosomal rRNA genes of *Drosophila* // Nature.—1976.—263, N 5572.— P. 27—36.
3. Dawid I. B., Botchan P. Sequences homologous to ribosomal insertion occur in the *Drosophila* genome outside the nucleous organizer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 10.— P. 4233—4237.
4. Ribosomal insertion-like elements in *D. melanogaster* are interspersed with mobile sequences / I. B. Dawid, E. O. Long, P. P. Dinocera, N. L. Pardue // Cell.—1981.—25, N 2.— P. 339—408.
5. Изучение клона *DmA89*, представителя нового семейства мобильных диспергированных генов *Drosophila melanogaster* / Р. П. Вашакидзе, А. М. Колчинский, Н. А. Тамарина и др. // V Всесоюз. симпоз. «Молекуляр. механизмы генет. процессов»: Тез. докл.— М., 1983.— С. 13.
6. Гены *Drosophila melanogaster*, кодирующие богатые полиаденилированные мРНК: клонирование, локализация и экспрессия / А. М. Колчинский, Р. П. Вашакидзе, Е. В. Ананьев и др. // Молекуляр. биология.—1985.—19, № 6.— С. 1569—1577.
7. Uneven distribution of cloned transcribed DME sequences in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* / А. М. Kolchinsky, R. P. Vashakidze, E. Yu. Kupert, L. I. Korochkin // Cell Differ.—1986.—18, N 2.— P. 145—149.
8. Dispersed repeats in *Drosophila virilis*: elements mobilized by interspecific hybridization / E. S. Zelentsova, R. P. Vashakidze, A. S. Krayev, M. B. Evgenyev // Chromosoma.—1986.—93, N 6.— P. 469—476.

Ин-т молекуляр. биологии и биол. физики АН ГССР,
Тбилиси

Получено 12.10.87