

Т. Ю. Юсупов, Р. М. Наурузбаєва, П. Р. Хазратов, А. П. Ібрагімов

**ВИЯВЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА МІТОХОНДРІАЛЬНИХ ПЛАЗМІДОПОДІБНИХ ДНК БАВОВНИКУ**

Методом диференційного та рівноважного ультрацентрифугування у градієнті щільності CsCl-Hoechst 33258 з етиолованих паростків бавовнику виділено мітохондріальну ДНК.

Методами електронної мікроскопії та електрофорезу в агарозному гелі показано, що мітохондрії бавовнику виду *G. hirsutum L.* (сорт 108-Ф), окрім основної форми ДНК високої молекулярної маси, містять дві мінікільцевих ДНК розміром 6,5 та 2,4 тис. пар нуклеотидів.

При співставленні результатів аналітичного ультрацентрифугування та електрофорезу розподілення продуктів розщеплення ДНК клітинних органелів рестриктазою *EcoRI* дійшли висновку, що плазмідоподібна ДНК має мітохондріальне походження і не містить помітних домішок ДНК ядер і пластид.

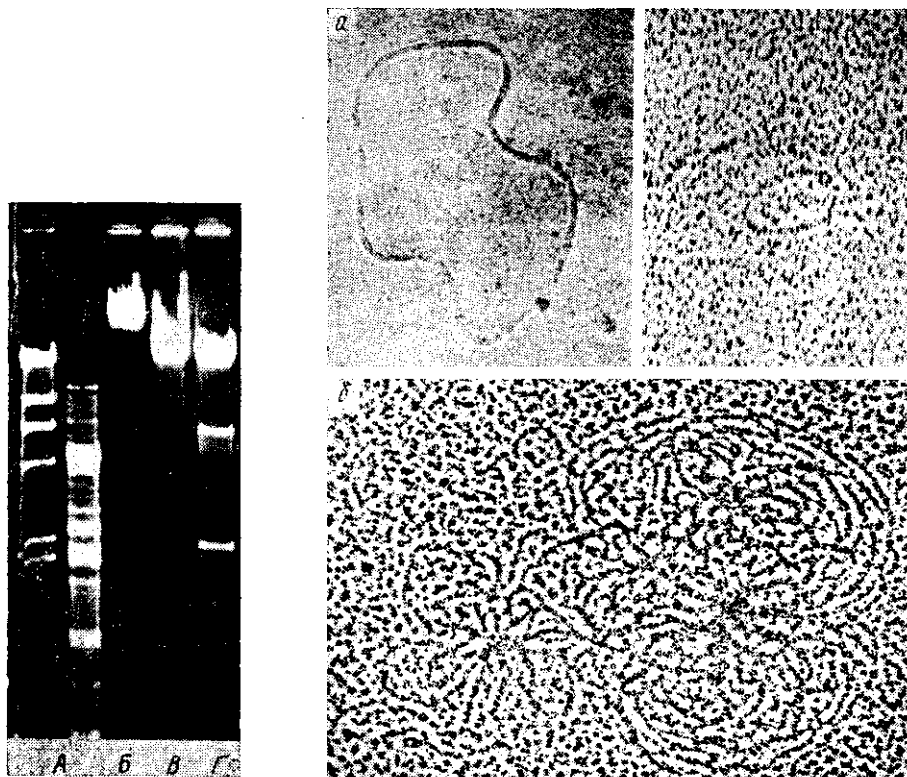
**Вступ.** Останнім часом поряд з дослідженням структурних і функціональних особливостей ядерного геному рослин все більше уваги привертає вивчення генетичної системи хлоропластів та мітохондрій у зв'язку з можливістю використання інтактних органел та їх генетичних елементів в експериментах з генетичної і клітинної інженерії [1—3]. При цьому особливий інтерес викликає аналіз *ARS*-фрагментів ДНК клітинних органел та плазмід як можливого засобу при конструюванні потенційних векторів рослин. Проте у рослинному світі плазмідиди зустрічаються надзвичайно рідко. Лише у мітохондріях деяких видів вищих рослин виявлено низькомолекулярні плазмідоподібні (пп) ДНК [4—7]. В літературі будь-які відомості про структуру і функції ДНК мітохондрій (мтДНК) бавовнику відсутні.

У даній роботі нами вперше надається повідомлення про виділення та характеристики мітохондріальних ппДНК бавовнику.

**Матеріали і методи.** Експерименти виконані на дводенних паростках бавовнику сорту 108-Ф виду *G. hirsutum L.* Оголене сірчаною кислотою насіння бавовнику вимочували одну добу у дистильованій воді при кімнатній температурі, потім пророщували при 28 °С на протязі 48 год у термостаті. Паростки бавовнику ретельно промивали деіонізованою водою і стерилізували 70 %-м розчином етанолу з наступним ретельним промиванням деіонізованою водою. Паростки подрібнювали у високошвидкісному гомогенізаторі типу MPW-302 (Польща) на протязі 30 с у середовищі, яке містить 50 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 0,3 М маніт, 5 мМ ЕДТА, 4 мМ аскорбінову кислоту, 4 мМ β-меркаптоетанол, 1 %-й полівінілпіралідон, 0,1 %-й альбумін, 0,25 мМ октанол. Гомогенат фільтрували крізь два шари капрону та центрифугували на протязі 15 хв при 3 000 об/хв у бакет-роторі центрифуги К-26 (Німеччина) для видалення ядер і пластид. Надосадову рідину центрифугували при 15 000 об/хв на центрифугі К-24 для отримання мітохондрій. Утворений осад мітохондрій суспендували у 20 мл буферного розчину (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 0,3 М сахароза, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 %-й альбумін), додавали до нього панкреатичну ДНКазу у концентрації 50 мкг/мл і залишали на протязі 1 год при 4 °С. До суспензії мітохондрій, які були оброблені панкреатичною ДНКазою, додавали 200 мл буферу (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 0,6 М сахароза, 20 мМ ЕДТА) і центрифугували при 10 000 об/хв на протязі 15 хв. Сформований осад мітохондрій суспендували у 30 мл буферу гомогенізації та нашаровували на ступеневий градієнт концентрації сахарози: 1,6 М (8 мл), 0,9 М (10 мл). Градієнт центрифугували на протязі 120 хв при 22 000 об/хв у препаративній ультрацентрифугі К-32 М, ротор С 30. Шар, який містив мітохондрії, збирали і розводили у буфері (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 20 мМ ЕДТА) до кінцевої концентрації сахарози 0,3 М. Мітохондрії осаджували цент-

рифугуванням при 15 000 об/хв на протязі 15 хв. Усі процедури, пов'язані з виділенням та очищенням мітохондрій, провадили при 4 °С.

Осад мітохондрій ресуспендували тефлоновим гомогенізатором у середовищі, яке містило 50 мМ трис-НСІ, рН 8,0, 20 мМ ЕДТА, 2 %-й саркозилат натрію, 0,5 мг/мл протеїнази К, та витримували 1 год при 37 °С. Отриманий лізат двічі депротейнізували рівним об'ємом суміші фенол : хлороформ (50 : 50), насиченим 0,1 М трис-НСІ, рН 8,0, 0,1 %-м оксихіноліном, 0,2 %-м β-меркаптоетанолом, і одноразово — сумішшю



Мал. 1. Електрофоретичний аналіз ДНК клітинних органелів бавовнику у 1 %-му агарозному гелі. Як маркери використовували продукти розщеплення ДНК бактеріофагу λ рестриктазою *HindIII* та *PstI* (а); б — яДНК; в — хпДНК; г — мтДНК

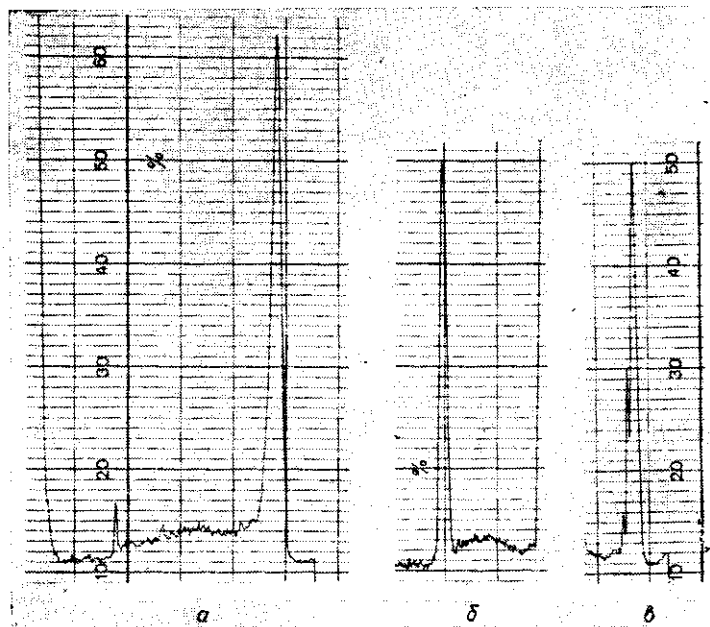
Мал. 2. Електронно-мікроскопічні фотографії мтДНК: а — мінікільцеві мтДНК; б — складноорганізована високомолекулярна мтДНК.  $\times 30\ 000$ — $45\ 000$

хлороформ: ізоаміловий спирт (25 : 1). Вводну фазу відбирали і осаджували 2,5 об'єму охолодженого етанолу, попередньо додавши 3 М ацетат натрію, рН 5,8, до 0,3 М. Осад ДНК розчиняли у 4,5 мл буферу (10 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 1 мМ ЕДТА) і додавали 4,5 г сухого CsCl, 30 мкг/мл Hoechst 33258 (Ht).

Центрифугування у градієнті щільності CsCl-Ht провадили у бакет-роторі с45 ультрацентрифуги К-32 при 37 000 об/хв на протязі 48 год при 18 °С. Після закінчення центрифугування смуги ДНК, що флюоресцювали в УФ-світлі, обережно відбирали шприцем і видаляли Ht з розчину ДНК п'ятиразовим екстрагуванням ізопропанолом, насиченим 5 М CsCl. Розчин ДНК діалізували на протязі 3—4 год з п'ятиразовою зміною буферу (10 мМ трис-НСІ, рН 8,0, 1 мМ ЕДТА) для видалення CsCl та осаджували 2,5 об'єму охолодженого етанолу у присутності 0,3 М ацетату натрію. Осад ДНК двічі промивали 80 %-м етанолом, підсушували на протязі 5 хв під вакуумом і розчиняли у 100 мкл бідистильованої води. Ядерну (яДНК) і хлоропластну (хпДНК) ДНК виділяли раніше використовуваними методами [8]. Аналітичне ультра-

центрифугування мтДНК у градієнті щільності CsCl провадили на ультрацентрифузі «Spinco», обладнаній УФ-оптичною системою [9]. Обробку ДНК рестрикційними ендонуклеазами, електрофорез, фотографування гелів здійснювали за стандартними методиками Маніатиса та ін. [10]; електронно-мікроскопійне дослідження препаратів мтДНК — методами Кляйншміда [11].

**Результати і обговорення.** Раніше нами було показано, що мтДНК бавовнику відрізняються за своїми основними структурними характеристиками від яДНК та хпДНК [8, 12]. Користуючись методом ульт-



Мал. 3. Денситограма УФ-знімків розподілу препаратів мтДНК (а), комплексу мтДНК — Hoechst (б) і тотальної ДНК (в) бавовнику у градієнті щільності CsCl. Як реперний зразок використовували ДНК *Sarcina lutea* із щільністю  $1,731 \text{ г·см}^{-3}$  при  $25^\circ\text{C}$

рацентрифугування у лінійному градієнті щільності CsCl-Ht з наступним електрофоретичним аналізом отриманих окремих фракцій ДНК, було виявлено ще одну відзначальну особливість препаратів мтДНК бавовнику, яка полягає у наявності в них низькомолекулярних плазмідоподібних молекул. На мал. 1 наведено дані електрофоретичного аналізу мтДНК бавовнику. Як видно з мал. 1 (д), препарати мтДНК, крім основної високомолекулярної ДНК, містять низькомолекулярні фракції, позначені нами *pGHm1* і *pGHm2*. Порівнянням електрофоретичної рухливості низькомолекулярних ДНК з такою лінійних маркерних фрагментів відомої довжини було встановлено, що розмір ппДНК складає приблизно 6,5 та 2,4 тис. пар нуклеотидів. У препаратах яДНК та хпДНК бавовнику відсутні фракції ДНК, які мігрують повільно (мал. 1, в, г).

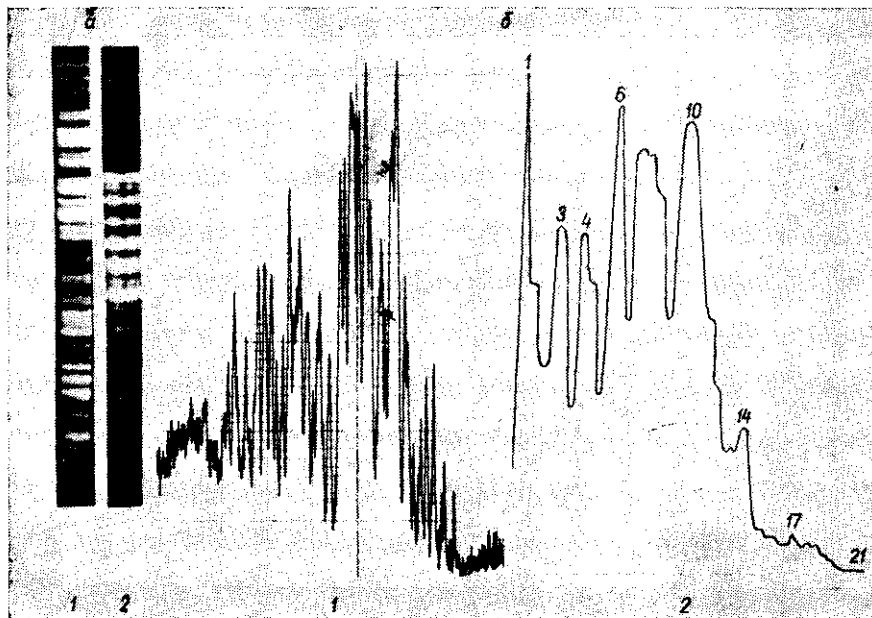
Електронно-мікроскопічні фотографії мтДНК наведено на мал. 2. Видно, що мтДНК бавовнику має високомолекулярну та складноорганізовану структуру з наявністю різних за формою молекул ДНК.

Для з'ясування ступеню чистоти мтДНК і відповідно ппДНК від домішок яДНК та хпДНК ми співставили розподіл у лінійному градієнті CsCl мтДНК та сумарних препаратів ДНК бавовнику (мал. 3). З наведених на малюнках даних випливає, що препарати мтДНК, виділені з очищених мітохондрій, характеризуються розподілом у вигляді симетричного піка із щільністю  $1,706 \text{ г·см}^{-3}$ . Це відповідає 46,0 мол. % GC-пар основ (див. мал. 3, а). Аналогічний характер роз-

поділу у градієнті щільності CsCl виявляє комплекс мтДНК — Нt (див. мал. 3, б). На відміну від мтДНК сумарні препарати ДНК бавовнику розподіляються на три фракції (див. мал. 3, в). Величина плавучої щільності основної фракції ДНК складала  $1,692 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ , а двох мінорних —  $1,697$  та  $1,706 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ .

З порівняння цих результатів випливає те, що у препаратах мтДНК не міститься помітних домішків ДНК ядер та пластид.

До аналогічного висновку приводять дані, отримані на підставі рестрикційного аналізу ДНК клітинних органодів бавовнику, які свід-



Мал. 4. Електрофоретичний розподіл *EcoRI*-фрагментів мтДНК (а) і хпДНК (б) бавовнику у 1 %-му агарозному гелі та денситограми негатива гелю

чать про те, що профіль розподілу рестрикційних фрагментів мтДНК істотно відрізняється від хпДНК (мал. 4) та яДНК [12].

Для одержання більш докладної характеристики структури і функцій ппДНК мітохондрій бавовнику потрібні додаткові експерименти.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Cloning vectors of mitochondrial origin for eukaryotes: a new concept in genetic engineering* / K. Esser, U. Kück, U. Stahl, P. Tudzynski // *Curr. Genet.*— 1983.— 7.— P. 239—243.
2. *Кларк М., Рудельхюбер Т., Шей Дж. Методы генетики соматических клеток.*— М.: Мир, 1985.— Т. 1.— С. 238—246.
3. *Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений.*— Киев: Наук. думка, 1982.— 102 с.
4. *Unique DNA associated with mitochondria in the «S»-type cytoplasm of male-sterile maize* / D. R. Pring, C. S. Levinge III, W. W. L. Hu, D. H. Timothy // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1977.— 74, N 5.— P. 2904—2908.
5. *Powling A. Species of small DNA molecules found in mitochondria from sugarbeet with and male-sterile cytoplasm* // *Mol. and Gen. Genet.*— 1981.— 183, N 1.— P. 82—84.
6. *Plasmid-like DNAs associated with mitochondria of cytoplasmic male-sterile soghum* / D. R. Pring, M. F. Conde, K. F. Schertz, C. S. Levinge III // *Ibid.*— 1982.— 186, N 2.— P. 180—184.
7. *Nikiforova I. D., Negruk V. I. Comparative electrophoretical DNAs in Vicia faba and in some other legumes* // *Planta.*— 1983.— 157, N 1.— P. 81—84.
8. *Получение чистых препаратов ДНК из клеточных органодов хлопчатника и некоторые данные об их структурной организации* / Т. Ю. Юсупов, А. А. Ирисметов, Н. А. Рахматов, А. П. Ибрагимов // *Физиология и биохимия культур. растений.*— 1985.— 17, № 2.— С. 157—162.

9. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its bouyant density in CsCl // J. Mol. Biol.—1962.—4, N 3.— P. 430.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
11. Kleinschmidt A. K. Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules // Meth. Enzymol.—1968.— 12b.— 361 p.
12. Юсупов Т. Ю. Сравнительное исследование структурной организации ДНК хлопчатника некоторых видов хлопчатника: Дис. ... канд. биол. наук.— Ташкент, 1982.— 119 с.

Ин-т експерим. біології рослин АН Узбекистану,  
НВО «Біолог», Ташкент

Одержано 03.07.91

УДК 575.113.1—575.155—577.113.083

Ю. В. Пацковський, В. В. Гайдук, О. В. Веселовський, О. І. Зубко,  
Т. П. Пастернак, Л. М. Юркевич, С. Г. Машталер, А. І. Потопальський

### ВИЯВЛЕННЯ *pUC19*-ГОМОЛОГІЧНИХ ПОВТОРЮВАНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ У ГЕНОМІ ДЕЯКИХ ВИДІВ ВИЩИХ РОСЛИН

За допомогою методу блот-гібридації за Саузерном у складі ядерної ДНК кількох видів вищих рослин (*Secale cereale*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Solanum nigrum*, *S. tuberosum*, *Atropa belladonna*, *Lycopersicon esculentum*) виявлено послідовності, що повторюються, гомологічні ДНК плазміді *pUC19*. У складі геномної ДНК жита і красавки вони розміщені у вигляді кластерів. Встановлено розбіжності у числі та організації *pUC*-повторів в геномах різних видів і окремих ліній (поколінь — у жита) одного виду. Показано можливість використання *pUC*-повторів як маркерів при соматичній гібридації беладонни та тютюну. Обговорюється можливий зв'язок виявлених фактів з нестабільністю генома рослин.

**Вступ.** Кількість послідовностей, які повторюються, у геномі рослин дуже велика і звичайно складає більше 98 % усієї геномної ядерної ДНК. Причому відносна кількість повторів у геномі вищих рослин значно (у 10 і більше разів) перевищує таку у переважної більшості видів тварин [1]. Роль і значення окремих одиниць геному, що повторюються, таких як генів рРНК, гістонів, тРНК, досить відомі. Проте для основної маси повторів їх роль і структура зовсім нез'ясовані. Внаслідок цього послідовності геному рослин, які повторюються, досить інтенсивно вивчаються. Рядом дослідників були виділені й охарактеризовані як кластеровані, так і дисперговані повторювані елементи геному рослин, наприклад, тютюну, *Nicotiana tabacum* [2], томатів, *Lycopersicon esculentum* [3, 4], *Arabidopsis thaliana* [5], жита, *Secale cereale* [5, 7], *Mb01*-повтори у п'яти видів вищих рослин [8], елементи сателітної ДНК, що повторюються [9, 10]. Інтерес дослідників обумовлений фактами виявлення відмін у числі, розташуванні або величині гомологічних повторів у геномах окремих видів та родин рослин. Така варіабельність свідчить про особливу роль повторів у складі геномів та про певну нестабільність останніх. У межах одного й того ж виду рослин варіації у числі й розташуванні повторюваних одиниць звичайно не виявляються, що є підставою для проведення так званої «геномної дактилоскопії», у тому числі з використанням ДНК фага *M13* як молекулярного зонду [11].

Проводячи гібридацію з різними ДНК-зондами, які вбудовані в ДНК плазміді *pUC19*, ми виявили, що існує значна імовірність наявності у геномі рослин послідовностей, гомологічних плазмідній ДНК. Оскільки не виключена можливість використання таких послідовностей як геномних маркерів при статевій і соматичній гібриди-

© Ю. В. ПАЦКОВСЬКИЙ, В. В. ГАЙДУК, О. В. ВЕСЕЛОВСЬКИЙ, О. І. ЗУБКО,  
Т. П. ПАСТЕРНАК, Л. М. ЮРКЕВИЧ, С. Г. МАШТАЛЕР, А. І. ПОТОПАЛЬСЬКИЙ, 1992