



УДК 577.2.633.16

ОБНАРУЖЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ГОМОЛОГИЧНЫХ МОБИЛЬНОМУ ЭЛЕМЕНТУ КУКУРУЗЫ, В ЯДЕРНОМ И ХЛОРОПЛАСТНОМ ГЕНОМАХ ХЛОПЧАТНИКА

[А. С. Садыков], Р. С. Мухамедов, В. М. Тушеев, Р. З. Гизатуллин,
А. А. Абдукаримов

Структурная организация генома растений привлекает в последнее время все большее внимание исследователей [1]. Во многих работах было показано, что для генома растений характерно высокое содержание фракции средних повторов и его существенная лабильность, являющаяся следствием такой насыщенности повторами. Вероятно, немалую роль в этом играют мобильные генетические элементы растений [2, 3].

В настоящее время лучше всего изучены мобильные генетические элементы кукурузы [4]. Имеются сведения об их наличии в геноме львиного зева и сои [5, 6]. Известно, что мобильные элементы, как правило, обладая строгой видоспецифичностью, в некоторых случаях встречаются у очень отдаленных между собой видов [6—8], что позволяет предположить возможность их горизонтального переноса в процессе эволюции. В связи с этим мы исследовали гибридизуемость рестриктных фрагментов генома хлопчатника (род *Gossypium*) с одним из *Ds*-элементов кукурузы (*Ds-6233*) [9], являющимся производным автономного *Ac*-элемента кукурузы с делцией около 2,5 тысяч пар оснований центральной части *Ac*-элемента.

Аналогичному анализу была подвергнута хлоропластная ДНК хлопчатника. Известно, что в хлоропластном геноме кодируется меньше половины полипептидов, необходимых для функционирования хлоропластов [10]. Большая часть из них кодируется в ядерном геноме и синтезируется на цитоплазматических рибосомах с последующим транспортом этих белков в хлоропласты. Таким образом, если верна эндосимбиотическая гипотеза происхождения хлоропластов [10], то следует постулировать, что в процессе эволюции произошел обширный перенос генов из хлоропластной ДНК в ядерный геном. Это заставляет предположить наличие генетических механизмов мобильности в хлоропластах. В этой связи мы проанализировали хлоропластную ДНК хлопчатника для выявления в ней последовательностей, гомологичных *Ds*-элементу.

Эксперименты выполнены на двухдневных проростках различных видов хлопчатника. Ядерную ДНК выделяли, замораживая проростки в жидком азоте и гомогенизируя в буферном растворе: 0,002 М трис-НСl, рН 8,0, 0,25 М сахараза, 0,05 М NaCl, 0,005 М MgCl₂, 0,005 М 2-меркаптоэтанол. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин, осадок ядер промывали буфером (0,05 М трис-НСl, рН 8,0, 0,025 М ЭДТА) и лизировали в буфере 0,05 М трис-НСl, рН 8,0, 0,1 М NaCl, 0,5 % DS-Na. Далее обрабатывали РНКазой до конечной концентрации 100 мкг/мл в течение 1 ч при 37 °С, а затем протеиназой К до конечной концентрации 200 мкг/мл также при 37 °С, 1 ч. После 3-кратных депротенизаций к водной фазе добавляли 2,5 объема спирта. ДНК наматывали на стеклянную палочку и растворяли в ТЕ-буфере (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА).

Выделение хлоропластной ДНК проводили по методу Тевари [11] из листьев 17-дневных проростков.

ДНК расщепляли рестриктазой *Bam*III (НПО «Фермент», Вильнюс). Электрофоретический анализ рестрицированной ДНК проводили электрофорезом в 1 %-ном вертикальном агарозном геле.

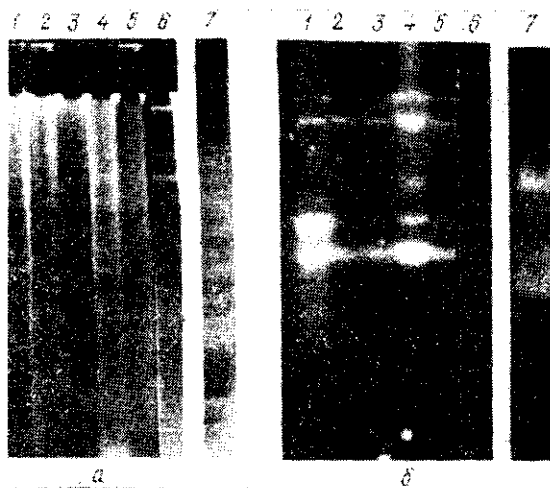
Блот-гибридизацию фракционированных фрагментов ДНК генома хлопчатника осуществляли по методу Саузерна [12].

Элемент *Ds-6233*, полученный из лаборатории проф. Штарлингера (Ин-т генети-

ки, Кельн, ФРГ), переклонирован нами в плазмиде *pBR322*. Радиоактивную метку вводили с помощью ннк-трансляции [13].

Фракционирование в 1 %-ном агарозном геле ДНК хлопчатника после обработки рестриктазой *BamHI* позволило выявить в ней большое количество дискретных фракций разного размера. Это хорошо видно на рисунке, где представлены картины расщепления ДНК трех видов хлопчатника *G. hirsutum*, *G. barbadense*, *G. herbaceum*, причем ДНК вида *G. hirsutum* выделялась среди промышленных сортов Ташкент-1 и 108-Ф и подвида *G. hirsutum ssp. mexicanum*. Даже у сортов одного вида наблюдаются отличия в наборах повторяющихся последовательностей, а картины различных видов не сходны существенно. Далее проводили перенос ДНК из геля на нитроцеллюлозный

Гибридизация ДНК *Ds*-элемента кукурузы с ДНК различных сортов и видов хлопчатника: *a* — электрофоретическое разделение фрагментов ДНК хлопчатника после расщепления рестриктазой *BamHI* в 1 %-ном агарозном геле (1 — ДНК *G. hirsutum*, сорт 108-Ф; 2 — ДНК *G. barbadense*, сорт С-6037; 3 — ДНК *G. herbaceum*, гуза; 4 — ДНК *G. hirsutum*, сорт Ташкент-1; 5 — ДНК *G. hirsutum, ssp. mexicanum*; 6 — ДНК фага λ ; 7 — ДНК из хлоропластов, сорт Ташкент-1); *b* — радиоавтограмма фильтра после гибридизации с [32 P]ДНК *Ds*-элемента



Hybridization of DNA of maize *Ds*-element with DNA of different cultivars and species of cotton: *a* — electrophoretic separation of cotton DNA fragments after restriction by *BamHI* in 1 % agarose gel (1 — DNA of *G. hirsutum*, cultivar 108-F; 2 — DNA of *G. barbadense*, cultivar C-6037; 3 — DNA of *G. herbaceum*, (guza); 4 — DNA of *G. hirsutum*, cultivar Tashkent-1; 5 — DNA of *G. hirsutum, ssp. mexicanum*; 6 — DNA of phage λ ; 7 — DNA of chloroplasts, cultivar Tashkent-1); *b* — blot-hybridization with [32 P]DNA of *Ds*-element

фильтр и гибридизовали с 32 P-меченной ДНК *Ds*-элемента (рисунок, б). Видно, что *Ds*-элемент гибридизуется с несколькими последовательностями геномов всех сортов и видов хлопчатника, причем интенсивность гибридизации различна. Две последовательности, приблизительно 13 и 4,5 тысяч пар оснований (т. п. о.), с которыми гибридизуется *Ds*-элемент, одинаковы во всех трех проанализированных видах, а для различных сортов вида *G. hirsutum* наблюдаются дополнительные полосы, отвечающие фрагментам ДНК размером 8 и 5,5 т. п. о. Разница в интенсивности гибридизации, по-видимому, определяется различием в степени гомологии (условия отмывки фильтра после гибридизации были достаточно мягкие — 0,5 объема буфера SSC). Выявленная гомология, разумеется, еще не означает, что обнаруженные последовательности выполняют в геноме хлопчатника функцию, аналогичную таковой *Ds*-элемента в геноме кукурузы. Последовательности, гомологичные концам *Ac*-элемента, одним из представителей которых является и использованный нами в работе *Ds*-элемент 6233, относятся к фракции средних повторов в геноме кукурузы и встречаются в нем несколько десятков раз. Функция этих последовательностей неясна. По всей вероятности, лишь небольшая часть из них является *Ac*-зависимыми *Ds*-элементами. Эти последовательности рассеяны по геному и не исключено, что такого рода последовательности являются потенциально мобильными, что обеспечивает мобильность генома в стрессовых условиях. Наличие гомологичных последовательностей в столь отдаленном виде может подтвердить возможность горизонтального переноса такого рода последовательностей. В этой связи интересно отметить, что еще Мак-Клянтон на основании своих чисто генетических данных предполагала, что генетическая система *Ac* — *Ds* имеет внешнее происхождение [14].

Последовательности, гомологичные *Ds*-элементу кукурузы, обнаруживаются не только в ядерном геноме, но и в геноме хлоропластов (рисунок, б, дорожка 7). Это может означать существование единой системы генетических элементов в ядерном и хлоропластном геномах, обеспечивающих скоординированные взаимные изменения обоих геномов и обмен генетической информацией между ними.

IDENTIFICATION OF SEQUENCES HOMOLOGOUS TO THE MOBILE ELEMENT OF MAIZE IN THE NUCLEAR AND CHLOROPLAST GENOMES OF COTTON

[A. S. Sadykov], R. S. Mukhamedov, V. M. Tuneyev, R. Z. Gizatullin, A. A. Abdugarimov

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Summary

Sequences homologous to the mobile genetic maize element Ds-6233 in nuclear and chloroplast genomes of different species and cultivars of cotton are identified by blot-hybridization. The pattern of hybridization is different in various cultivars and species.

1. Flavell R. B. Repeated sequences and genome architecture // Structure and function plant genomes.— New York: Acad. press, 1984.— P. 14.
2. Freeling M. Plant transposable elements and insertion sequences // Ann. Rev. Plant Physiol.— 1984.— 35.— P. 277—298.
3. Doring H. P., Starlinger B. P. Barbara McClintock's controlling elements. Now at the DNA level // Cell.— 1984.— 39, N 2.— P. 253—259.
4. Fedoroff N. Controlling elements in maize // Mobile genetic elements / Ed. Y. A. Shapiro.— New York: Acad. press, 1983.— P. 1—63.
5. Bonas U., Sommer H., Saedler H. The 17 kb *Mam1* element of *Antirrhinum majus* induced a 3 bp duplication upon integration into the chalcone synthase gene // EMBO J.— 1984.— 3, N 5.— P. 1015—1019.
6. Vodkin L. O., Rhodes P. R., Goldberg R. B. cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element // Cell.— 1983.— 34, N 15.— P. 1023—1031.
7. Садыков А. С., Мухамедов Р. С., Абдукаримов А. А. Анализ повторяющихся последовательностей ядерных ДНК различных видов хлопчатника // Новые направления биотехнологии: Тез. Всесоюз. конф.— Пушкино, 1984.— С. 76.
8. Ананьев Е. В., Чернышев А. И., Головкин М. В. Молекулярная организация последовательностей ДНК генома ячменя, родственных «Активатор»-элементу кукурузы // V Биохим. съезд: Тез. докл. (январь, Киев).— М.: Наука, 1986.— С. 115.
9. Doring H. P., Tillman E., Starlinger P. DNA sequences of the maize transposable element dissociation // Nature.— 1984.— 307, N 5947.— P. 127—130.
10. Ellis J. Mobile genes of chloroplasts and the promiscuity of DNA // Ibid.— 1983.— 304, N 5941.— P. 308—309.
11. Tewari K. K., William S. G. Chloroplast DNA from tobacco leaves // Science.— 1966.— 153, N 3741.— P. 1269—1271.
12. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis // Anal. Biochem.— 1983.— 135, N 1.— P. 237—251.
13. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I / P. W. J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes, P. Berg // J. Mol. Biol.— 1977.— 113, N 1.— P. 237—251.
14. McClintock B. The control of gene action in maize // Brookhaven Symp. Biol.— 1963.— 18.— P. 162—184.

Ин-т биоорг. химии АН УзССР, Ташкент

Получено 24.03.87

УДК 517.963.32:466.057

СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДИЛ-(5'→N)-ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АРГИНИН

В. Ф. Зарытова, Е. М. Иванова, С. Н. Ярмолюк, И. В. Алексеева

Для изучения структуры и свойств ковалентносвязанных нуклеиново-белковых комплексов широко используются модельные системы — нуклеотидил-(5'→N)-пептиды [1]. В связи с этим постоянно идет поиск и совершенствование методов их получения. Сложность в данном случае обусловлена многообразием функциональных групп пептидов и олигонуклеотидов. Существующие методы конденсации нуклеотида и пептида (аминокислоты) с помощью карбонимидов, карбонилдиимдазола, пирофосфатов и фосфитов нуклеозидов подробно рассмотрены в монографии [1] и обзоре [2].

Лучшим из них признан способ с применением дициклогексилкарбонимида (DCC) [1, 2]. Однако в случае образования олигонуклеотидил-(5'→N)-пептида время реакции составляет 72 ч, а выход целевого продукта не превышает 60 % [3].