

Т. Ю. Юсупов, Р. М. Наурузбаева, П. Р. Хазратов, А. П. Ибрагимов

ОБНАРУЖЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПЛАЗМИДОПОДОБНЫХ ДНК ХЛОПЧАТНИКА

Методом дифференциального и равновесного ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl-Hoechst 33258 из этиолированных проростков хлопчатника выделена митохондриальная ДНК.

Методами электронной микроскопии и электрофорезом в агарозном геле показано, что митохондрии хлопчатника вида *G. hirsutum* L. (сорт 108-Ф) помимо основной ДНК высокой молекулярной массы содержат две миникольцевые ДНК размером 6,5 и 2,4 тыс. пар нуклеотидов.

При сопоставлении результатов аналитического ультрацентрифугирования и электрофореза продуктов расщепления ДНК клеточных органелл рестриктазой EcoRI пришли к выводу, что плазмидоподобная ДНК имеет митохондриальное происхождение и не содержит заметных примесей ДНК ядер и пластид.

Введение. В последнее время наряду с исследованием структурных и функциональных особенностей ядерного генома растений все большее внимание привлекает изучение генетической системы хлоропластов и митохондрий в связи с возможностью использования интактных органелл и их генетических элементов в экспериментах по генетической и клеточной инженерии [1—3]. При этом особый интерес вызывает анализ ARS-фрагментов ДНК клеточных органелл и плазмид в качестве возможного средства при конструировании потенциальных векторов растений. Однако в растительном мире плазмиды встречаются крайне редко. Лишь в митохондриях некоторых видов высших растений обнаружены низкомолекулярные плазмидоподобные (пп) ДНК [4—7]. В литературе какие-либо сведения о структуре и функциях ДНК митохондрий (мтДНК) хлопчатника отсутствуют.

В данной работе нами впервые делается сообщение о выделении и характеристике митохондриальных ппДНК хлопчатника.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на двухдневных проростках хлопчатника сорта 108-Ф вида *G. hirsutum* L. Оголенные серной кислотой семена хлопчатника замачивали на 1 сут в дистиллированной воде при комнатной температуре, затем проращивали при 28 °С в течение 48 ч в термостате. Проростки хлопчатника тщательно промывали деионизированной водой и стерилизовали 70 %-ным раствором этанола с последующей тщательной промывкой деионизированной водой. Проростки измельчали в высокоскоростном гомогенизаторе типа MPW-302 (Польша) в течение 30 с в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,3 М маннит, 5 мМ ЭДТА, 4 мМ аскорбиновую кислоту, 4 мМ β-меркаптоэтанол, 1 %-ный поливинилпирролидон, 0,1 %-ный альбумин, 0,25 мМ октанол. Гомогенат фильтровали через два слоя капрона и центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин в бакет-роторе центрифуги К-26 (Германия) для удаления ядер и пластид. Надосадочную жидкость центрифугировали при 15 000 об/мин на центрифуге К-24 для получения митохондрий. Образовавшийся осадок митохондрий суспендировали в 20 мл буферного раствора (50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,3 М сахароза, 10 мМ MgCl₂, 0,1 %-ный альбумин), добавляли к нему панкреатическую ДНКазу в концентрации 50 мкг/мл и оставляли в течение 1 ч при 4 °С. К суспензии митохондрий, обработанных панкреатической ДНКазой, добавляли 200 мл буфера (50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,6 М сахароза, 20 мМ ЭДТА) и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 15 мин. Сформированный осадок митохондрий суспендировали в 30 мл буфера гомогенизации и наслаивали на ступенчатый градиент концентрации сахарозы: 1,6 М (8 мл), 0,9 М (10 мл). Градиент центрифугировали в течение 120 мин при 22 000 об/мин в препаративной ультрацентрифуге К-32 М, ротор С 30. Слой, включающий митохондрии, собирали и раз-

© Т. Ю. ЮСУПОВ, Р. М. НАУРУЗБАЕВА, П. Р. ХАЗРАТОВ, А. П. ИБРАГИМОВ, 1992

водили в буфере (50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 20 мМ ЭДТА) до конечной концентрации сахарозы 0,3 М. Митохондрии осаждали центрифугированием при 15 000 об/мин в течение 15 мин. Все процедуры, связанные с выделением и очисткой митохондрий, проводили при 4 °С.

Осадок митохондрий ресуспендировали тefлоновым гомогенизатором в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ ЭДТА,

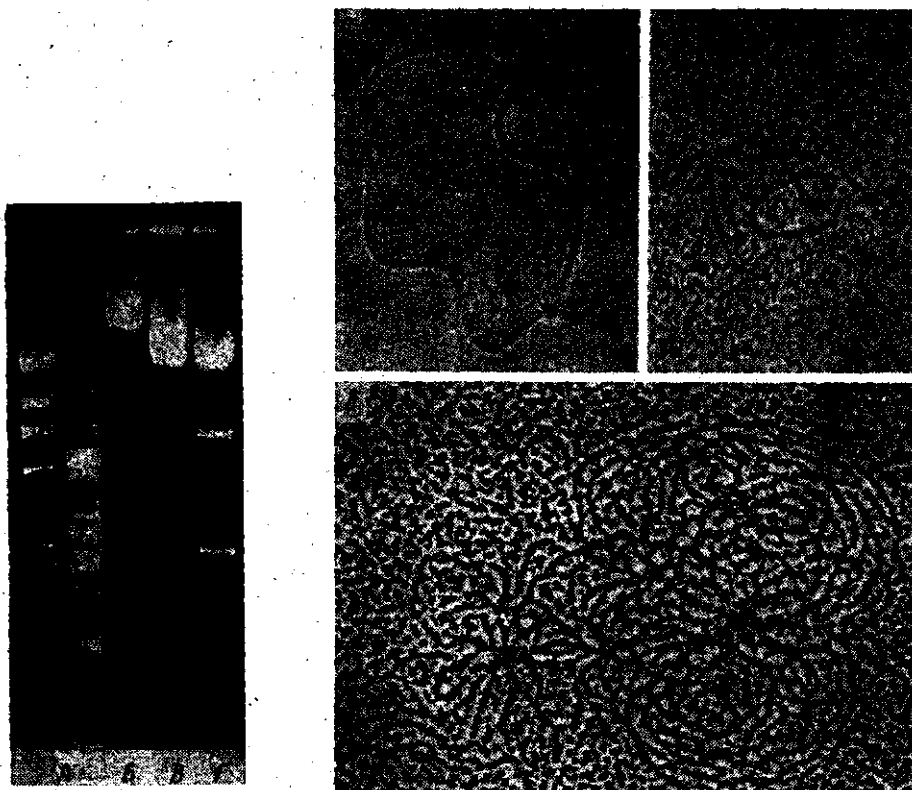


Рис. 1. Электрофоретический анализ ДНК клеточных органоидов хлопчатника в 1 %-ном агарозном геле. В качестве маркеров использовали продукты расщепления ДНК бактериофага λ рестриктазой *HindIII* и *PstI* (а); б — яДНК; в — хлДНК; г — мтДНК

Рис. 2. Электронно-микроскопические фотографии мтДНК: а — миникольцевые мтДНК; б — сложноорганизованная высокомолекулярная мтДНК. $\times 30\,000$ — $45\,000$

2 %-ный саркозилат натрия, 0,5 мг/мл протеиназы К, и выдерживали 1 ч при 37 °С. Полученный лизат дважды депротенизировали равным объемом смеси фенол:хлороформ (50:50), насыщенным 0,1 М трис-НСl, рН 8,0, 0,1 %-ным оксихинолином, 0,2 %-ным β -меркаптоэтанолом, и один раз — смесью хлороформ:изоамиловый спирт (25:1). Водную фазу отбирали и осаждали 2,5 объема охлажденного этанола, предварительно добавив 3 М ацетат натрия, рН 5,8, до 0,3 М. Осадок ДНК растворяли в 4,5 мл буфера (10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ ЭДТА) и добавляли 4,5 г сухого CsCl, 30 мкг/мл Hoechst 33258 (Ht).

Центрифугирование в градиенте плотности CsCl-Ht проводили в бакет-роторе с45 ультрацентрифуги К-32 при 37 000 об/мин в течение 48 ч при 18 °С. После окончания центрифугирования флюоресцирующие в УФ-свете полосы ДНК осторожно отбирали шприцем и удаляли Ht из раствора ДНК пятикратным экстрагированием изопропанолом, насыщенным 5 М CsCl. Раствор ДНК диализовали в течение 3—4 ч с пятикратной сменой буфера (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА) для удаления CsCl и осаждали 2,5 объема охлажденного этанола в присутствии 0,3 М ацетата натрия. Осадок ДНК дважды промывали 80 %-ным этанолом, подсушивали в течение 5 мин под вакуумом и растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды. Ядерную

(ядНК) и хлоропластную (хпДНК) ДНК выделяли ранее использованными методами [8]. Аналитическое ультрацентрифугирование мтДНК в градиенте плотности CsCl проводили на ультрацентрифуге «Spinco», снабженной УФ-оптической системой [9]. Обработку ДНК рестрикционными эндонуклеазами, электрофорез, фотографирование гелей осуществляли по стандартным методикам Маниатиса и др. [10];

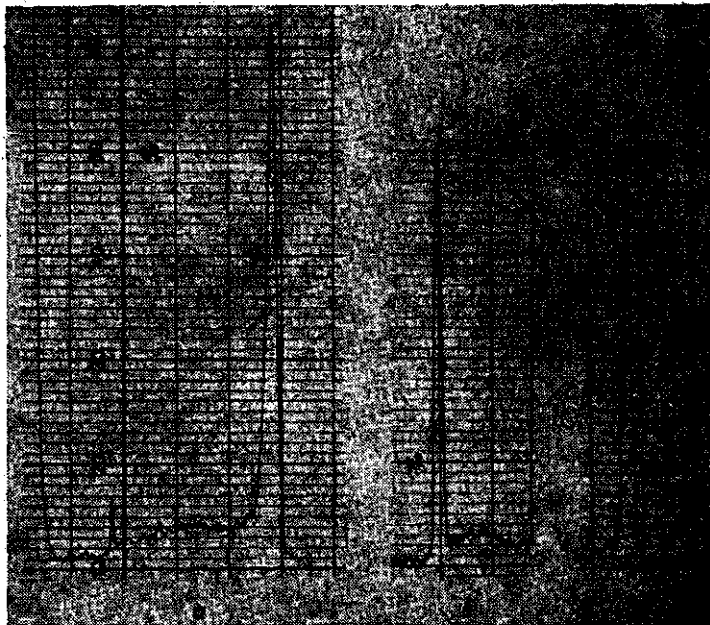


Рис. 3. Денситограмма УФ-снимков распределения препаратов мтДНК (а), комплекса мтДНК-Ноеchst (б) и тотальной ДНК (в) хлопчатника в градиенте плотности CsCl. В качестве реперного образца использовали ДНК *Sarcina lutea* с плотностью $1,731 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ при 25°C .

электронно-микроскопическое исследование препаратов мтДНК — методами Кляйншмидта [11].

Результаты и обсуждение. Ранее нами показано, что мтДНК хлопчатника отличаются по своим основным структурным характеристикам от яДНК и хпДНК [8, 12]. Используя метод ультрацентрифугирования в линейном градиенте плотности CsCl-H₂O с последующим электрофоретическим анализом полученных отдельных фракций ДНК, была обнаружена еще одна отличительная особенность препаратов мтДНК хлопчатника, заключающаяся в наличии в них низкомолекулярных плазмидоподобных молекул. На рис. 1 представлены данные электрофоретического анализа мтДНК хлопчатника. Как видно из рис. 1 (д), препараты мтДНК помимо основной высокомолекулярной ДНК содержат низкомолекулярные фракции, обозначенные нами *pGHm1* и *pGHm2*. Сравнением электрофоретической подвижности низкомолекулярных ДНК с таковой линейных маркерных фрагментов известной длины было установлено, что размер ппДНК составляет приблизительно 6,5 и 2,4 тыс. пар нуклеотидов. В препаратах яДНК и хпДНК хлопчатника отсутствуют медленно мигрирующие фракции ДНК (рис. 1, в, г).

Электронно-микроскопические фотографии мтДНК представлены на рис. 2. Видно, что мтДНК хлопчатника имеет высокомолекулярную и сложноорганизованную структуру с наличием различных по форме молекул ДНК.

Для выяснения степени чистоты мтДНК и соответственно ппДНК от примесей яДНК и хпДНК мы сопоставили распределения в линейном градиенте CsCl мтДНК и суммарных препаратов ДНК хлопчатника (рис. 3). Из представленных на рисунках данных следует, что препараты мтДНК, выделенные из очищенных митохондрий, характеризу-

ются распределением в виде симметричного пика с плотностью $1,706 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$. Это соответствует 46,0 мол. % GC-пар оснований (см. рис. 3, а). Аналогичный характер распределения в градиенте плотности CsCl проявляет комплекс мтДНК—Нt (см. рис. 3, б). В отличие от мтДНК суммарные препараты ДНК хлопчатника разделяются на три

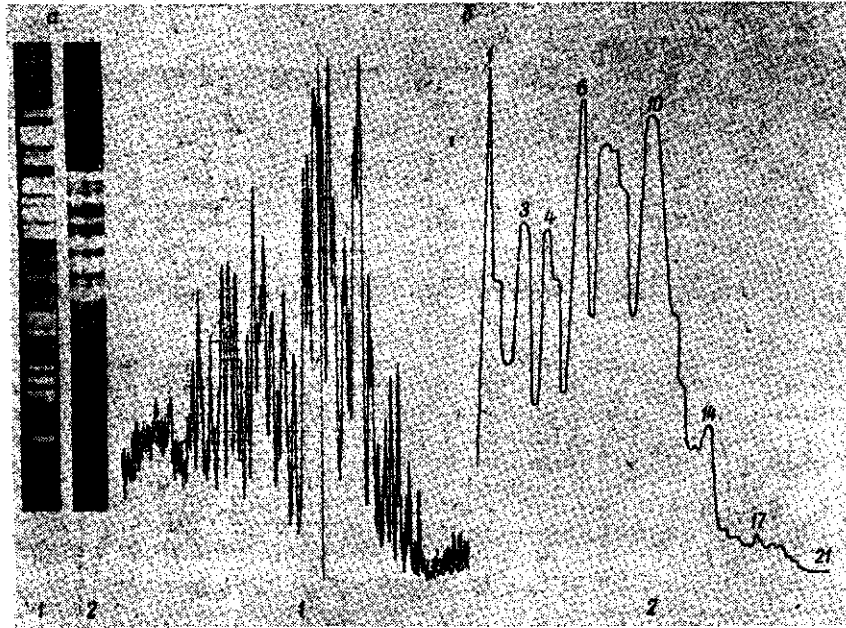


Рис. 4. Электрофоретическое разделение *EcoRI*-фрагментов мтДНК (а) и хпДНК (б) хлопчатника в 1%-ном агарозном геле и денситограммы негатива геля

фракции (см. рис. 3, в). Величина плавучей плотности основной фракции ДНК составляла $1,692 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$, а двух минорных — $1,697$ и $1,706 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$.

Из сравнения этих результатов следует вывод о том, что в препаратах мтДНК не содержится заметных примесей ДНК ядер и пластид.

К аналогичному заключению приводят данные, полученные на основании рестрикционного анализа ДНК клеточных органоидов хлопчатника, свидетельствующие о том, что профиль распределения рестрикционных фрагментов мтДНК существенно отличается от хпДНК (рис. 4) и яДНК [12].

Для получения более подробной характеристики структуры и функций ппДНК митохондрий хлопчатника необходимы дополнительные эксперименты.

Резюме. Методом дифференциального та рівноважного ультрацентрифугування в градієнті щільності CsCl-Hoechst 33258 із етильованих паростків бавовни виділено мітохондріальну ДНК.

Методами електронної мікроскопії та електрофорезом в агарозному гелі показано, що мітохондрії бавовни 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 електрофореграми розподілення продуктів розщеплення ДНК клітинних органоїдів рестриктазою *EcoRI* дійшли висновку, що плазмідоподібна ДНК має мітохондріальне походження і не містить помітних домішок ДНК ядер і пластид.

Summary. Mitochondrial DNA was extracted from ethylated seedlings of cotton using the methods of differential and equilibrial ultra centrifugation in CsCl-Hoechst 33258 density gradient.

By electron microscopy and agarose gel electrophoresis, it was shown that the mitochondria of cotton belonging to *G. hirsutum L.* species (variety 108-F) has an addition

to basic DNA of high molecular weight, two minicircular DNA of the size of 6.5 and 2.4 Kb.

Analysis of the results of analytical ultra centrifugation and electrophoregrams of the distribution of the products of segregation of DNA of the cell organelles using restriction enzyme *EcoRI* showed that the plasmid-like DNA has mitochondrial origin and that it does not contain significant impurities of nuclear and plastid DNA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. Снятие 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. Levings 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 sorghum / D. R. Pring, M. F. Conde, K. F. Schertz, C. S. Levings III // *Ibid.*—1982.—186, N 2.—P. 180—184.
7. Nikiiforova 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 органов 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 buoyant density in CsCl // *J. Mol. Biol.*—1962.—4, N 3.—P. 430.
10. Маннатис 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 хлоропластов некоторых видов хлопчатника: Дис. ... канд. биол. наук.— Ташкент, 1982.— 119 с.

Ин-т эксперим. биологии растений АН УзССР,
НИО «Биолог», Ташкент

Получено 03.07.91

УДК 575.113.1—575.155—577.113.083

Ю. В. Пацковский, В. В. Гайдук, О. В. Веселовский, Е. И. Зубко,
Т. П. Пастернак, Л. Н. Юркевич, С. Г. Машталер, А. И. Потопальский

ОБНАРУЖЕНИЕ rUC19-ГОМОЛОГИЧНЫХ ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ГЕНОМЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Методом блот-гибридизации по Саузерну изучали наличие и организацию повторяющихся последовательностей, гомологичных ДНК плазмиды rUC19, в геноме некоторых видов высших растений семейства злаковых (рожь, кукуруза, пшеница) и пасленовых (паслен, табак, красавка, картофель). Часто повторяющиеся rUC-гомологичные последовательности обнаружены в составе ядерной ДНК ржи (две линии, полученные из сорта Житомирская), пшеницы (сорт Сибирская 18), паслена (одна линия из трех), красавки. rUC-повторы присутствуют в виде нескольких сотен или тысяч копий на геном в составе ДНК картофеля (сорт Зареве), томатов (сорт К-139), кукурузы (две линии сорта PLS-72). Показано, что rUC-гомологичные последовательности могут быть использованы в качестве маркера при анализе соматических гибридов красавка+табак. Найдены различия в числе и организации rUC-повторов в составе геномов разных поколений (F₂ и F₄) двух линий ржи. Предполагается, что внутри- и межвидовой полиморфизм числа или организации rUC-гомологичных последовательностей может быть обусловлен нестабильностью генома растений.

© Ю. В. ПАЦОВСКИЙ, В. В. ГАЙДУК, О. В. ВЕСЕЛОВСКИЙ, Е. И. ЗУБКО,
Т. П. ПАСТЕРНАК, Л. Н. ЮРКЕВИЧ, С. Г. МАШТАЛЕР, А. И. ПОТОПАЛЬСКИЙ, 1992