



УДК 575.113:582.796

А. И. Марциновская, В. Л. Мотин,
Р. С. Мухамедов, А. А. Абдукаримов

ГЕНОМНАЯ «ДАКТИЛОСКОПИЯ» ХЛОПЧАТНИКА *GOSSYPIMUM*: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ ГИБРИДИЗАЦИОННОЙ ПРОБЫ ДНК ФАГА M13

*Геномная «дактилоскопия» с использованием в качестве гибридационной пробы ДНК фага M13 находит все более широкое применение в области исследования структуры генома растений. Сравнительный анализ гипервариабельных участков генома различных сортов и видов хлопчатника *Gossypium* показал, что эта технология позволяет выявить межсортовые и межвидовые различия.*

Введение. В настоящее время получил широкое распространение метод геномной «дактилоскопии» ДНК, позволяющий получать высокоспецифичную для каждого индивидуума и генетически закреплённую картину гибридизации — своего рода «дактилоскопический отпечаток» его генома. Джеффрис с соавт. [1], используя клонированную последовательность минисателлитной ДНК человека, первыми продемонстрировали способ множественного рестрикционного полиморфизма геномной ДНК. Развитию технологии геномных отпечатков способствовало также использование в качестве гибридационной пробы ДНК фага M13, который имеет в своем составе гипервариабельные повторы, образующие два кластера с 15-нуклеотидным мотивом в районе гена белка III бактериофага. При этом было показано, что не только ДНК человека и млекопитающих, но и ДНК беспозвоночных, растений и микроорганизмов, включая патогены, содержит многочисленные участки, гомологичные этому минисателлиту. Такие последовательности обладают высоким полиморфизмом, соматически стабильны и имеют менделевский характер наследования [2, 3]. Геномная «дактилоскопия» на основе ДНК фага M13 получает все более широкое признание и применяется для решения фундаментальных и прикладных проблем в медицине, генетике и селекции сельскохозяйственных животных и растений, для идентификации бактерий.

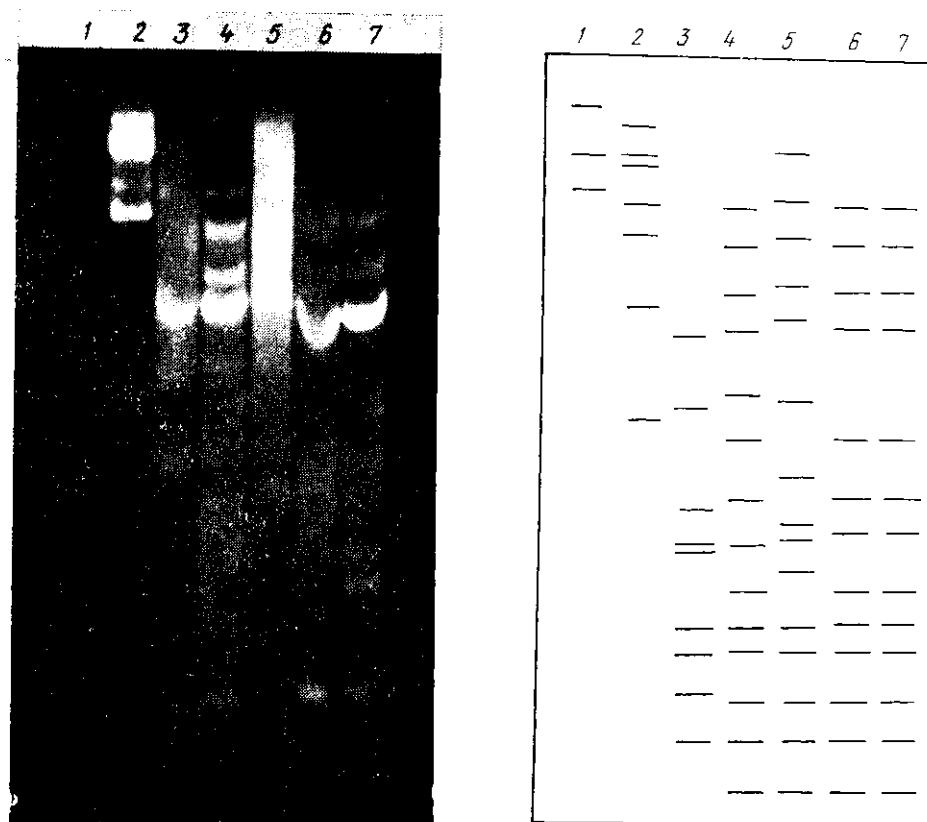
Впервые возможность выявления рестрикционного полиморфизма хлопчатника с помощью ДНК фага M13 в качестве зонда была показана Рысковым с соавт. [3—5]. Из работ этих авторов следовало, что ДНК фага M13 может служить эффективным молекулярно-генетическим маркером для геномной «дактилоскопии» ДНК хлопчатника.

В настоящей работе данный метод применен для нахождения диапазона возможностей использования ДНК фага M13 в качестве гибридационной пробы при фингерпринтировании ДНК хлопчатника, а именно: для обнаружения межвидовых и межсортовых различий.

Материалы и методы. В работе использованы сорта Ташкент-1 и 108-Ф *G. hirsutum* и А-833 *G. herbaceum*. ДНК из проростков сорта Ташкент-1 выделена методом с применением бромистого цетилтриметиламмония (ВСТА) [6]. Один из препаратов ДНК получен из материала после процедуры удаления пигмента: размолотую в жидком азоте ткань экстрагировали смесью этанола с эфиром (1:1) и затем аце-

© А. И. Марциновская, В. Л. Мотин, Р. С. Мухамедов, А. А. Абдукаримов, 1993

тоном. ДНК из листьев сорта 108-Ф *G. hirsutum*, а также из проростков сорта А-833 *G. herbaceum* выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности $CsCl$ [7]. ДНК человека из ядерной фракции жидких образцов крови любезно предоставлена М. Власовым (Ин-т молекуляр. генетики РАН, Москва) [8]. ДНК холерного вибриона получена стандартным фенольным методом [9]. Обработку рестриктазами, электрофорез в геле 0,9 %-й агарозы, перенос фрагментов ДНК на



Гипервариабельные участки, детектируемые ДНК фага *M13*: 1 — фага λ ; 2 — холерного вибриона; 3 — генома человека; 4 — 108-Ф *G. hirsutum*; 5 — А-833 *G. herbaceum*; 6, 7 — Ташкент-1

нитроцеллюлозные фильтры проводили согласно руководству [9]. Гибридизацию с высокоочищенной ДНК фага *M13* осуществляли, используя метод, описанный в работе [10]. Условия гибридизации со специально клопированной минисателлитной пробой Джеффриса (33.6), полученной на основе ДНК человека (производство фирмы «ICI», Англия), были такими же, как условия гибридизации с ДНК человека [11].

Результаты и обсуждение. На рисунке приведены результаты блот-гибридизационного анализа ДНК, выделенных из вышеописанных объектов. Выявлены гибридизующиеся фрагменты у ДНК хлопчатника (13—16 полос), что свидетельствует о наличии в этих фрагментах ДНК участков гомологии с гибридной пробой.

Сравнительный анализ гипервариабельных последовательностей двух видов хлопчатника показывает, что *G. hirsutum* (Ташкент-1 и 108-Ф) отличается от *G. herbaceum* А-833 по количеству (3 и 2 фрагмента), расположению и интенсивности полос гибридизации (см. рисунок).

Таким образом, данный метод позволяет выявить межвидовые различия у хлопчатника. При фингерпринтировании ДНК сортов Ташкент-1 и 108-Ф одного вида *G. hirsutum* картины гибридизации также

отличаются, несмотря на высокий процент совпадающих полос. Это дает основание для продолжения эксперимента по сравнению фингерпринтов разных сортов хлопчатника с целью создания их генетического паспорта.

Сравнение методов свидетельствует в пользу применения метода выделения ДНК с помощью центрифугирования в градиенте CsCl. Полосы гибридизации более четкие, хотя метод с использованием ВСТА-а дает хорошее разрешение в области фрагментов небольшой молекулярной массы (2 тыс. п. о.).

Была проведена гибридизация вышеуказанных проб ДНК с меченой пробой Джеффриса, представляющей собой гипервариабельную минисателлитную ДНК человека, используемую также для выявления рестрикционного полиморфизма. В результате получены очень слабые сигналы гибридизации, указывающие на необходимость специально подбирать условия гибридизации ДНК хлопчатника с этой пробой.

Как следует из вышеприведенных данных, индивидуальный полиморфизм гипервариабельных участков ДНК в сочетании с их соматической стабильностью позволяет использовать ДНК фага *M13* в качестве гибридизационной пробы обнаружения межвидовых и межсортовых различий у хлопчатника. Полученные геномные фингерпринты обладают ярко выраженными видо- и сортоспецифическими отличиями и могут служить критериями определения таксономической принадлежности, «генетической» паспортизации сортов и видов, а также для установления их биологического и эволюционного родства.

Summary. DNA fingerprinting using *M13* phage DNA as a probe is a new approach of a great value for genetic investigating genomic structure of plants. A comparative analysis of hypervariable polymorphic patterns of various species and varieties of cotton *Gossypium* showed this method allows to establish distinctions between species and varieties.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L.* Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA // *Nature*.— 1985.— 314, N 6006.— P. 67—73.
2. *Vassart G., Georges M., Monsieur R. et al.* A sequence in *M13* phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA // *Science*.— 1987.— 235, N 4789.— P. 683—684.
3. *Ryskov A. P., Jincharadze A. G., Prosnjak M. I. et al.* *M13* phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms // *FEBS Lett.*— 1988.— 233, N 2.— P. 388—392.
4. *Джинчарадзе А. Г., Носнов П. Л., Рысков А. П.* Геномная «дактилоскопия». Характеристика клонированной последовательности JN600 генома человека, обладающей в составе вектора *M13* свойствами высокополиморфного маркера ДНК // *Д-кл. АН СССР*.— 1987.— 295, № 1.— С. 230—233.
5. *Рысков А. П., Джинчарадзе А. Г., Просняк М. И. и др.* Геномная «дактилоскопия» организмов различных таксономических групп: использование в качестве гибридизационной пробы ДНК фага *M13* // *Генетика*.— 1988.— 24, № 2.— С. 227—238.
6. *Taylor B., Poowell A.* Isolation of plant DNA and RNA // *Focus*.— 1983.— 4, N 3.— P. 4—6.
7. *Weeks D. P., Beerman X., Griffith O. M.* A small-scale five-hour procedure for isolation multiple samples of CsCl-purified DNA: application to isolations from mammalian, insect, higher plant, algal, yeast and bacterial sources // *Anal. Biochem.*— 1986.— 152, N 1.— P. 376—385.
8. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* *Molecular cloning: A laboratory manual*.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.— 420 p.
9. *Манятис Т., Фриш Э., Самбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
10. *Рысков А. П., Фаизов К. Х., Алимов А. М., Романова Е. А.* Геномная «дактилоскопия»: новые возможности в определении видовой принадлежности брусцелл // *Генетика*.— 1990.— 26, № 1.— С. 130—132.

Ин-т биорг. химии им. акад. А. С. Садыкова АН РУз,
Ташкент

Получено 18.06.92