



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

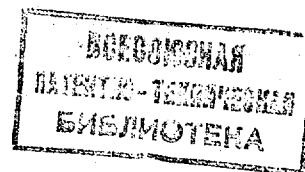
(19) SU (11) 1784139 A1

(51)5 A 01 H 1/00

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР
(ГОСПАТЕНТ СССР)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



1

(21) 4911255/13
(22) 08.01.91
(46) 30.12.92. Бюл. № 48
(71) Белорусский научно-исследовательский институт лесного хозяйства
(72) Г.Г.Гончаренко, В.Г.Кривко и В.В.Потенко
(56) Алтухов Ю.П. и др. Аллозимный полиморфизм в природной популяции ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. - Генетика, 1986, т.22, № 8, с.2135-2151.
Крутовский К.В. и др. Аллозимный полиморфизм в природной популяции ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. - Генетика, 1986, т.22, № 9, с.2310-2316.

2

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ МУТАЦИЙ ПРИ РАДИОНУКЛИДНОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ

(57) Использование: биотехнология, лесное хозяйство, радиобиология. Сущность изобретения: определяют уровень мутаций при радионуклидном заражении путем гомогенизации эндосперма семян ели европейской и электрофоретического разделения изоферментов эндосперма в крахмальном геле, после которого в полученном изоферментном спектре исследуют весь набор генов, кодирующих соответствующие изоферменты, и учет мутаций ведут только по генам, находящимся в гомозиготном состоянии.

Изобретение относится к лесному хозяйству и может быть использовано в области селекции и семеноводства для определения степени радиационного поражения семенного материала, а также в области радиационной генетики для оценки генетических последствий Чернобыльской аварии.

Известен способ определения частоты мутаций с использованием эндоспермов ели европейской, заключающийся в гомогенизации эндоспермов, центрифугировании гомогенатов, внесении полученной надосадочной жидкости в полиакриламидный гель (далее по тексту ПААГ), проведении электрофореза и выявлении фракций фермента путем гистохимического окрашивания, с последующим учетом нетипичных вариантов, отсутствующих у исследуемого дерева.

Недостаток описанного способа заключается, во-первых, в использовании ПААГ,

что не позволяет исследовать за один электрофоретический анализ более чем 1-2 ферментных системы, т.е. производительность данного способа мала, поскольку за один электрофоретический анализ исследуя 15-30 эндоспермов, получим только 30-60 локус-тестов. Это особенно существенно при исследованиях частоты возникновения мутаций, требующих десятков и сотен тысяч локустестов. К тому же для электрофореза в ПААГ гомогенат необходимо отцентрифугировать, что усложняет технологию исследования. Также немаловажным моментом является та особенность, что ПААГ зачастую вносит искажения во фракции изоферментов. Во-вторых, существенным недостатком описанного способа является включение в исследование генов, находящихся как в неизменчивом (гомозиготном) состоянии так и в изменчивом (гетерозиготном) состоянии, что, в последнем случае, делает невозможным выявление таких мутационных собы-

(19) 20 (11) 1784139 A1

тий, когда один вариант гена мутирует в другой вариант, встречающийся в норме у данного дерева. Принимая во внимание низкую частоту возникновения мутаций (10^{-4} – 10^{-6}), неучет даже одного мутантного события сильно изменяет общую картину мутационного процесса.

Цель изобретения состоит в повышении производительности и точности способа определения частоты мутаций в эндоспермах ели европейской при радионуклидном загрязнении.

Это достигается тем, что с целью повышения производительности при электрофоретическом исследовании применяется крахмальный гель, не требующий предварительного центрифугирования гомогената и не вносящий искажения во фракции изоферментов. Крахмальный гель после одного электрофоретического анализа разрезается на 8–10 горизонтальных пластин и путем гистохимического окрашивания исследуется весь набор генов, кодирующих соответствующие 8–10 ферментных систем. Для повышения точности учет мутаций ведется только по генам, находящимся в гомозиготном состоянии у исследуемого дерева.

Предлагаемый способ был опробован на семенном материале ели европейской, собранном в районах, подвергшихся радионуклидному загрязнению вследствие аварии на Чернобыльской АЭС. Эндоспермы освобождались от оболочки, гомогенизировались и без предварительного центрифугирования, на отдельную дорожку крахмального геля помещался гомогенат одного эндосперма. Поиск мутаций велся по генам, которые находились в гомозиготном состоянии у анализируемых деревьев. В этом случае, после электрофореза при гистохимическом окрашивании выявляется ровный ряд фракций фермента и любой эндосперм, показавший отклонение от этого электрофоретического спектра, должен рассматриваться как мутантный по анализируемому гену. Известно, что большинство мутаций по структурному гену или изменяет

электрофоретическую подвижность соответствующего фермента, или нарушает функцию гена, и тогда, из-за отсутствия генного продукта, окрашенная фракция на гелевой пластине не появится (нуль-мутация). При электрофоретическом анализе эндоспермов были найдены оба типа мутаций (фиг. 1). Обнаружена нуль-мутация по гену алкогольдегидрогеназы (ADH), произошедшая у эндосперма, расположенного на дорожке 8; в этом образце полностью отсутствует продукт гена Adh. Найдена мутация с изменением подвижности, произошедшая по гену глутаматдегидрогеназы (GDH). На спектре GDH четко видна фракция с измененной подвижностью, расположенная на дорожке 2. По гену Gdh вариант 1,00 перешел в вариант 0,75. Следует подчеркнуть, что если бы исследовалось дерево гетерозиготное по вариантам 1,00 и 0,75 глутаматдегидрогеназы, то такая мутация не могла бы быть уточнена.

Использование предлагаемого изобретения позволяет существенно (в 4–6 раз) повысить производительность электрофоретического способа определения частоты мутаций в эндоспермах ели европейской и позволяет практически со 100%-ной точностью учитывать случаи мутаций.

Формула изобретения

Способ определения уровня мутаций при радионуклидном загрязнении, включающий гомогенизацию эндосперма семян ели европейской, внесение гомогената в гель-носитель, электрофоретическое разделение изоферментов, гистохимическое окрашивание для проявления электрофоретических спектров изоферментов, их анализ и учет мутаций, отличающийся тем, что, с целью повышения точности и информативности исследования, в качестве носителя используют крахмальный гель, после проявления спектров гель разрезают на 8–10 пластин, исследуют весь набор генов, кодирующих соответствующие изоферменты, и учет мутаций ведут только по генам, находящимся в гомозиготном состоянии.

Редактор А. Павлова

Составитель Г. Гончаренко
Техред М.Моргентал

Корректор Н. Кешеля

Заказ 4323

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101