

Г. П. МИРОШНИЧЕНКО, А. С. АНТОНОВ, К. М. ВАЛЬЕХО-РОМАН
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КИНЕТИКИ РЕАССОЦИИ
ДЕНАТУРИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТИРОВАННЫХ ДНК
НЕКОТОРЫХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 15 XI 1971)

Известно, что различные фракции фрагментированных ДНК высших организмов после денатурации реассоциируют с неодинаковой скоростью (¹⁻⁶). Анализ кинетических кривых, характеризующих этот процесс, по мнению ряда авторов (¹⁻¹⁰), позволяет судить о принципах строения и организации нуклеотидных последовательностей в геномах организмов. Такие характеристики первичных структур ДНК совершенно необходимы для строгой, количественной интерпретации данных, получаемых методом молекулярной гибридизации ДНК (^{7, 8}). Имеющиеся в литературе по

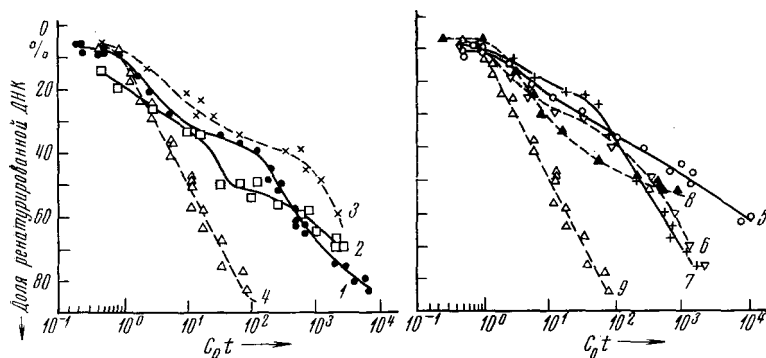


Рис. 1. Кинетика реассоциации ДНК: 1 — *Allium cepa*, 2 — *Allium oleraceum*; 3 — *Juno vicaria*; 4 — *E. coli*; 5 — *Allium porrum*; 6 — *A. shoenoprasum*; 7 — *A. ursinum*; 8 — *A. kuncianum*; 9 — *E. coli*

этому вопросу данные, касающиеся высших растений, крайне немногочисленны (^{4, 7, 9}). Поскольку нами проводились (¹²) и проводятся опыты по молекулярной гибридизации ДНК однодольных растений, очевидный интерес представляло исследование кинетики реассоциации их денатурированных, фрагментированных ДНК. Для этой цели мы применили метод хроматографии на колонках с гидроксипатитом (ГА), подробно описанный Бернарди (¹⁴). Полученные описанными ранее методами (^{11, 12}) препараты нативной ДНК деградировали в растворе ультразвуком до фрагментов с молекулярным весом порядка $0,5 \cdot 10^6$ (¹³). Фрагменты ДНК денатурировали натриевой щелочью (рН 12—13, 60°), раствор затем нейтрализовали и инкубировали при 60° в течение разного времени и при разных концентрациях ДНК в растворе. Аликвоты инкубационной смеси наносили на колонки с ГА для разделения денатурированных и реассоциировавших фрагментов.

На рис. 1 представлены кривые, отражающие кинетику процесса реассоциации ДНК изученных видов высших растений и кишечной палочки. По оси ординат отложена доля ренатурировавшейся ДНК (в%), а по оси абсцисс — величина C_0t , введенная Бриттенем и Коном (⁴) и представляющая собой произведение исходной концентрации денатурированных

фрагментов ДНК (в молях нуклеотидов на 1 л) на время протекания процесса ренатурации при 60° (в секундах). Видно, что кривые, характеризующие реассоциацию ДНК высших растений, отличаются от кривой реакции 2-го порядка, полученной для кишечной палочки, которая имеет просто устроенный геном, без заметной фракции повторяющихся последовательностей (¹). Большинство кривых, представленных на рис. 1, имеет двухфазный характер. Анализ этих кривых позволяет сделать вывод

о наличии в ДНК изученных видов высших растений как повторяющихся последовательностей нуклеотидов, образующих группы с разной численностью членов, так и фракции уникальных последовательностей.

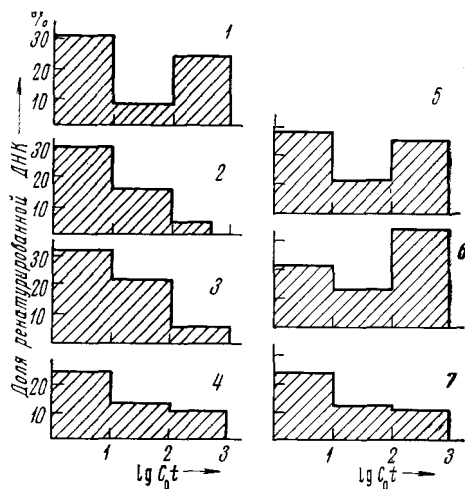


Рис. 2

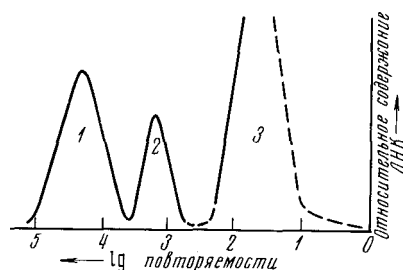


Рис. 3

Рис. 2. Относительное содержание фракций, реассоциирующих с различной скоростью, в ДНК некоторых однодольных растений

Рис. 3. Частота встречаемости нуклеотидных последовательностей различной степени повторяемости в ДНК *Allium cepa*. 1 — 24% (4000—10 000 копий), 2 — 10% (1000—3000 копий), 3 — 66% (~1000 копий)

Как видно из рис. 1, во всех изученных ДНК имеется фракция, ренатурирующая с большей скоростью, чем удается измерить в наших условиях с помощью хроматографии на ГА. Эта фракция является двуспиральной уже при $C_0t = 0,5$ и составляет от 6% (*Allium kumpseanum*) до 14% (*A. olerophyllum*) всей ДНК.

Рассмотрим подробнее в качестве примера кривую, отражающую ход реассоциации ДНК *Allium cepa* (рис. 1, 1). Как видно из рисунка, примерно 31% этой ДНК реассоциирует при $C_0t \leq 10$, более медленно реассоциирующий компонент ($C_0t \leq 10^2$) составляет около 8%. При $C_0t \geq 10^2$ происходит ренатурация остальной, наиболее медленно реассоциирующей фракции ДНК.

Аналогичные выводы о характере распределения в геномах нуклеотидных последовательностей, реассоциирующих с различной скоростью, можно сделать и для ДНК других изученных видов растений.

На рис. 2 представлено относительное содержание в исследованных ДНК фракций, ренатурирующих в интервалах между тремя произвольно выбранными значениями C_0t ($C_0t = 10; 100; 1000$). Как видно из рис. 2, количественное содержание фракции ДНК, которая может быть названа «относительно быстро ренатурирующей» ($C_0t = 10$), у изученных видов достаточно мало различается. Фракции ДНК, ренатурирующие при $C_0t = 10-100$, у большинства исследованных видов также близки, за исключением *A. olerophyllum*. Самые большие различия наблюдаются в количественном содержании фракций ДНК, ренатурирующих с наименьшей скоростью ($C_0t = 1000$).

Тот факт, что в величинах «относительно быстро ренатурирующих» фракций ДНК ($C_0t = 10$) удалось обнаружить только сравнительно не-

большие различия, представляет интерес с точки зрения работ по молекулярной гибридизации ДНК. Дело в том, что в условиях, используемых обычно для гибридизации ДНК, в реакции образования «гибридов» участвуют только быстро реассоциирующие фракции ДНК, поскольку достигаемые при этом значения C_{ot} недостаточны для медленно реассоциирующих уникальных последовательностей нуклеотидов (¹). В случае резких различий в содержании быстро ренатурирующих фракций в ДНК гибридизуемых видов может наблюдаться так называемая «сверхгибридизуемость», когда степень гибридизации ДНК в гетерологичной системе превышает соответствующую величину, получаемую в гомологичной системе. Учитывая обнаруженное нами сходство в количественном содержании «относительно быстро ренатурирующих» фракций в ДНК исследованных растений, можно сделать вывод о возможности использования молекулярной гибридизации ДНК однодольных растений для изучения степени гомологичности их геномов.

Представленные на рис. 1 кривые, при относительном сходстве их общего характера, на отдельных своих участках имеют неодинаковый наклон. Это свидетельствует о некоторых различиях в частоте встречаемости отдельных нуклеотидных последовательностей. Ранее было показано (¹), что время ренатурации ДНК прямо пропорционально размеру генома и обратно пропорционально частоте встречаемости данной нуклеотидной последовательности в ДНК. Используя кривые реассоциации изученных растительных ДНК и ДНК *E. coli* (организма с геномом известного размера и без заметной доли повторяющихся последовательностей нуклеотидов), можно рассчитать частоту встречаемости сходных по первичной структуре нуклеотидных последовательностей в геномах изучаемых растений. В качестве примера на рис. 3 приведена графическая характеристика генома *A. сера*. Судя по этим данным, около 24% всей ДНК *A. сера* представлено группами сходных последовательностей нуклеотидов с числом членов от 4000 до 10000. Примерно 10% ДНК составляют последовательности, повторяющиеся 1000—3000 раз. Остальная часть генома очень неоднородна и содержит более редко встречающиеся нуклеотидные последовательности. Следует отметить, что в ДНК *A. сера* имеется, по-видимому, крайне незначительное число истинно уникальных последовательностей, каждая из которых представлена в геноме в виде единственной копии. Как видно из рис. 1, это повышенное содержание повторяющихся последовательностей в геноме и относительно низкое количество уникальных последовательностей характерно и для других исследованных нами высших растений. Аналогичные наблюдения были сделаны для ДНК представителей другой группы однодольных растений: пшеницы, ржи, ячменя и овса (¹), а также для двудольных растений: гороха (¹⁰), пивлики и некоторых выюнков (⁹). Возможно, низкое содержание уникальных нуклеотидных последовательностей является чертой, присущей геномам высших растений, и отражает особенности их эволюции.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
2 XI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. J. Britten, D. E. Kohne, *Carnegie Inst. Year Book* 1965—1966, № 65, 1967, p. 78. ² A. McLaren, P. M. B. Walker, *Gen. Res.*, 6, 230 (1965). ³ B. L. McCaughy, B. J. McCarthy, *Biochemical Genetics*, 4, 425 (1970). ⁴ Е. И. Маркина, А. С. Антонов, А. Н. Белозерский, *ДАН*, 184, № 2, 483 (1969). ⁵ W. Hennig, J. Hennig, H. Stein, *Chromosoma*, 32, 31 (1970). ⁶ E. Davidson, B. R. Hough, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 63, 342 (1969). ⁷ A. J. Bendich, B. J. McCarthy, *Genetics*, 65, 545 (1970). ⁸ B. J. McCarthy, R. B. Churce, *Ann. Rev. Biochem.*, 39, 718 (1970). ⁹ D. G. Searcy, A. J. McInnis, *Evolution*, 24, 796 (1970). ¹⁰ Y. M. Sivolap, J. Bonner, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 387 (1971). ¹¹ J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, 3, 208 (1961). ¹² А. Г. Слюсаренко, Сборн. Строение ДНК и положение организмов в системе, М., 1971. ¹³ Y. Miyazawa, C. A. Thomas jr., *J. Mol. Biol.*, 11, 223 (1965). ¹⁴ G. Bernardi, *Nature*, 206, 779 (1965).