

Г. И. КИРЬЯНОВ, В. Ю. ПОЛЯКОВ, Ю. С. ЧЕНЦОВ

## БИОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПРОБЛЕМЕ ПОЛИНЕМНОСТИ ХРОМОСОМ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. С. Спириным 15 V 1974)

Изучение кинетики реассоциации ДНК позволило выявить у многих высших животных организмов классы уникальных последовательностей ДНК, т. е. таких последовательностей, которые встречаются в геноме только один раз (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>).

Однако анализ некоторых работ (<sup>3</sup>, <sup>4</sup>) показывает, что у ряда высших организмов — таких, как амфибии или некоторые растения, истинно уникальных генов обнаружить не удается. По-видимому, в этих случаях можно говорить о многократной повторенности всех последовательностей ДНК в составе генома (<sup>5</sup>).

В настоящей работе приводятся доказательства в пользу такого предположения, полученные из анализа кривых кинетики реассоциации ДНК высших растений, опубликованных разными авторами (<sup>6-9</sup>).

Как известно, скорость реассоциации ДНК уменьшается с увеличением числа различных последовательностей ДНК в геноме, т. е. пропорционально размеру генома. Для количественного анализа кинетики реассоциации удобно пользоваться величиной  $C_0t$  \* или  $C_0t^{1/2}$ , т. е. тем значением  $C_0t$ , при котором реассоциирует половина всей ДНК. В стандартных условиях реассоциации (<sup>1</sup>) величина  $C_0t$  прямо пропорциональна размеру генома.

При сопоставлении величины  $C_0t$  для ДНК таких организмов, в геноме которых практически отсутствуют повторы и кинетика реассоциации ДНК описывается кривой реакции второго порядка (например *Escherichia coli* и *Neurospora crassa*), должна соблюдаться следующая пропорция:

$$\frac{C_0t^{1/2} N. crassa}{C_0t^{1/2} E. coli} = \frac{\text{размер генома } N. crassa \text{ (в граммах)}}{\text{размер генома } E. coli \text{ (в граммах)}} \quad (1)$$

Так как известно, что скорость реакции реассоциации и, следовательно, величина  $C_0t$  зависит от нуклеотидного состава ДНК, пропорция (1) справедлива только при коррекции значений  $C_0t$  по ГЦ, которая проводилась нами для всех препаратов ДНК.

Определение размеров генома из данных кинетики реассоциации несколько усложняется при анализе геномов, содержащих класс (классы) повторяющихся последовательностей, так как  $C_0t^{1/2}$  суммарной ДНК отражает не только размер генома, но и степень повторяемости не уникальных последовательностей. В таком случае приходится прибегать к установлению доли уникальных последовательностей и корректировке этого значения  $C_0t^{1/2}$ , исходя из доли уникальных.

С этой целью можно отсечь часть кривой при ее переходе на плато и таким образом выделить участок кривой, соответствующий реассоциации уникальных последовательностей генома.

\*  $C_0t$  — начальная концентрация ДНК (в молях оснований на 1 л), умноженная на время реассоциации в секундах (<sup>1</sup>).

Так, доля уникальных последовательностей ДНК мыши (рис. 1) графически оценивается в 60% от генома; следовательно, должна быть справедлива пропорция

$$\frac{0,6C_0t^{1/2} \text{ мыши}}{C_0t^{1/2} \text{ E. coli}} = \frac{\text{Количество ДНК на 1 гаплоид мыши} \times 0,6}{\text{Количество ДНК на 1 клетку E. coli}} \quad (\text{II})$$

Как следует из кривой реассоциации (рис. 1),  $C_0t^{1/2}$  мыши  $1,7 \cdot 10^3$ ;  $C_0t^{1/2}$  E. coli 1,8. Количество ДНК на гаплоидный набор хромосом у мыши составляет  $2,5 \cdot 10^{-12}$ , у E. coli  $4,0 \cdot 10^{-15}$  (табл. 1). Корректируя  $C_0t^{1/2}$  по нуклеотидному составу (ГЦ E. coli 50 мол.%, ГЦ мыши 40 мол.%) и подставляя значения в уравнение II, получим  $0,66 \cdot 10^3 \approx 0,62 \cdot 10^3$ .

Таблица 1

№№ п. п.	Объект	Число хромосом на 1 гаплоид	Колич. ДНК на 1 гаплоид, г	ГЦ, мол. %	$C_0t^{1/2}$ *, скорректированный на ГЦ	$C_0t^{1/2}$ объекта/ $C_0t^{1/2}$ E. coli	Колич. ДНК объекта/Колич. ДНК E. coli	Число моногеномов	Колич. ДНК на 1 моногеном, г
1	E. coli**	1	$4 \cdot 10^{-15}$ (11)	50	—	—	—	1	$4 \cdot 10^{-15}$
2	Neurospora crassa	7	$3,3 \cdot 10^{-14}$ (9)	50 (9)	30	8,1	8,2	1	$3,3 \cdot 10^{-14}$
3	Drosophyla melanogaster	4	$1,2 \cdot 10^{-13}$ (2)	43 (11)	60	30	30	1	$1,2 \cdot 10^{-13}$
4	Mus musculus	20	$2,5 \cdot 10^{-12}$ (12)	40 (13)	1300	660	620	1	$2,5 \cdot 10^{-12}$
5	Rattus norvegicus	21	$2,85 \cdot 10^{-12}$ (12)	43 (13)	1750	730	710	1	$2,85 \cdot 10^{-12}$
6	Allium schoenoprasum L.	8	$0,84 \cdot 10^{-11}$ (12)	40 (14)	800	80	2100	26	$3,2 \cdot 10^{-13}$
7	Allium cepa L.	8	$1,67 \cdot 10^{-11}$ (12)	36 (14)	670	67	4170	62	$2,7 \cdot 10^{-13}$
8	Lilium henryi	12	$4,8 \cdot 10^{-11}$ (8)	38 (14)	187	47	1200	250	$2 \cdot 10^{-13}$

\*  $C_0t^{1/2}$  определялся для уникальных последовательностей (см. в тексте).

\*\* Значение  $C_0t^{1/2}$  E. coli взяты из тех же работ, в которых исследовалась кинетика реассоциации ДНК объекта.

Таким образом, учитывая ошибку графического метода обработки кривой и погрешность самого метода кинетики реассоциации, можно считать, что размер генома, определенный в единицах  $C_0t$ , практически совпадает с размером генома, выраженным в граммах. Аналогичные результаты получены нами при обчете кривых реассоциации ДНК крысы, нейроспоры и Лэйрдом для ДНК мыши и дрозофилы (2).

Совершенно иная картина обнаруживается, если тот же метод применить для анализа кривых реассоциации ДНК некоторых растений с большим геномом (Allium cepa, Allium schoenoprasum, Lilium henryi). В этом случае выявляется парадоксальное несоответствие между размером генома, определенным по кинетике реассоциации ДНК, и теми данными, которые получены из прямого определения количества ДНК на ядро. В этом легко убедиться на примере А. сера. Если исходить из того, что на долю уникальных последовательностей в геноме А. сера приходится примерно 67%, то скорректированный по нуклеотидному составу  $C_0t^{1/2}$  составит  $0,67 \cdot 10^3$  (табл. 1). Отношение  $C_0t^{1/2}$  А. сера к  $C_0t^{1/2}$  E. coli в этом случае 67. Отношение размеров геномов тех же объектов (в граммах) равно  $4,17 \cdot 10^3$ . Таким образом,  $C_0t^{1/2}$  для уникальных последовательностей ДНК А. сера в 62 раза меньше, чем следует ожидать, исходя из прямого определения размера генома. Объяснить этот результат можно только тем, что в геноме А. сера имеется 62 идентичных копии всех последовательностей ДНК. У другого вида лука, А. schoenoprasum, который содержит вдвое меньшее количество ДНК на ядро, гаплоидный геном представлен 26 идентичными копиями (табл. 1).

Полученные результаты, как нам представляется, дают возможность сделать некоторые предварительные выводы о принципах структурной организации хромосом высших растений. У тех растений, для которых удалось проанализировать кривые реассоциации ДНК, обнаруживается различная степень повторности всего генома. У растений с малым размером генома, как, например, у льна, по-видимому, имеются уникальные гены (7). Следовательно, хромосома льна может быть однонитчатой. Однако это утверждение нельзя считать абсолютно доказанным, так как кривая кинетики реассоциации льна, представленная в работе (7), не может быть корректно обчислена предлагаемым методом.

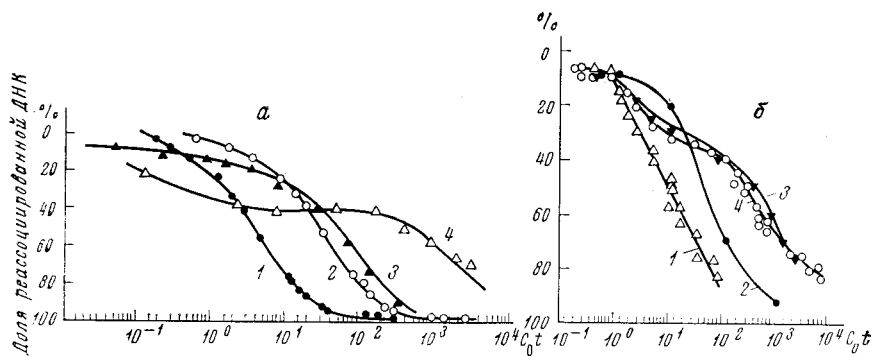


Рис. 1. Кривые реассоциации ДНК различных объектов. Для а: 1 — *E. coli* (9), 2 — *Neurospora crassa* (9), 3 — *Drosophyla melanogaster* (2), 4 — *Mus musculus* (2). Для б: 1 — *E. coli* (6), 2 — *Lilium henryi* (8), 3 — *Allium cepa* (6), 4 — *Allium schoenoprasum* (6)

На основании анализа кинетики реассоциации ДНК невозможно сделать выбор между тандемной повторностью генов и целых геномов или же латеральным расположением геномов. Тем не менее, можно утверждать, что геномы *A. cepa*, *A. schoenoprasum* и *L. henryi* состоят из нескольких копий, т. е. в гаплоидных геномах этих объектов можно выделить несколько идентичных функциональных единиц, содержащих полный набор генетической информации. Такой единичный набор всех геномов, описываемый характерной для каждого организма кривой реассоциации, мы предлагаем назвать моногеномом. У некоторых изученных животных, низших растений (*N. crassa*) (табл. 1) и, по-видимому, у отдельных высших растений (лен) моногеном соответствует геному. У других высших растений геном может состоять из многих моногеномов (табл. 1).

Обращает на себя внимание тот факт, что у двух видов луков, отличающихся количеством моногеномов, отдельный моногеном содержит приблизительно одно и то же количество ДНК. Сходным размером моногенома обладает *Lilium henryi* и *Linum usitatissimum* (табл. 1). Таким образом, можно думать, что у растений, обладающих чрезвычайно большим содержанием ДНК, количество генетической информации во много раз меньше, чем это следует из размера их генома. Важное следствие из этого состоит в том, что для сопоставления «количества информации» у различных объектов необходимо сопоставлять размеры их моногеномов, а не те количества ДНК, которые содержатся в гаплоидных наборах хромосом.

В том случае, если моногеном представляет собой не только функциональную единицу, но и единую обособленную структуру, можно говорить об истинной структурной многонитчатости хромосом некоторых растений. При латеральной упаковке моногеномов различия в содержании ДНК на хромосому у близких видов растений должны сопровождаться различиями в толщине хромосом. Именно такая закономерность была отмечена на примере хромосом видов *Allium* (*A. cepa* и *A. fistulosum*), *Lathyrus* (*L. gorgonii* и

*L. hirsitus*) и *Vicia* (*V. faba* и *V. sativa*) (<sup>10</sup>). Эти данные можно рассматривать как косвенное подтверждение в пользу латеральной упаковки отдельных нитей (соответствующих моногенам) в составе хромосом перечисленных растений.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
5 IV 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. I. Britten, D. E. Kohne, *Science*, v. 161, 529 (1968). <sup>2</sup> Ch. D. Laird, *Chromosoma*, v. 32, 378 (1971). <sup>3</sup> А. Караванов, А. Б. Иорданский, *Мол. биол.*, т. 5, 778 (1971). <sup>4</sup> N. Straus, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 68, № 4, 799 (1971). <sup>5</sup> Г. П. Георгиев, *Усп. биол. хим.*, т. 16, 4 (1973). <sup>6</sup> Г. П. Мирошниченко, А. С. Антонов, К. М. Вальехо-Роман, *ДАН*, т. 205, 1243 (1972). <sup>7</sup> S. A. Cullis, *Nature*, v. 243, 5409, 515 (1973). <sup>8</sup> D. R. Smyth, H. Stern, *Nature*, v. 245, 19 (1973). <sup>9</sup> S. K. Chattopadhyay, D. E. Kohne, S. K. Dutta, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 69, 3256 (1972). <sup>10</sup> Ю. С. Ченцов, В. Ю. Поляков, *Ультраструктура клеточного ядра*, М., 1974. <sup>11</sup> D. Cairns, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, XXVIII, v. 43 (1963). <sup>12</sup> H. Rees, R. N. Jones, *Int. Rev. Cytol.*, v. 32, 1, 52 (1972). <sup>13</sup> F. E. Arrighi, M. Mandel et al., *Biochem. Genetics*, v. 4, 367 (1970). <sup>14</sup> А. Г. Слюсаренко, *Строение ДНК и положение организмов в системе*, М., 1972.