

М. Б. АМЕРХАНОВА, А. Р. ФЕДОТОВ, А. Н. ШИЯН,
Ю. П. ВИНЕЦКИЙ

РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ РЕСТРИКЦИОННОЙ НУКЛЕАЗОЙ *EcoRI*

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 13 XI 1975)

Эндонуклеазы рестрикции типа в последнее время широко используются для анализа ДНК бактериофагов и вирусов. Эндонуклеаза *EcoRI* фрагментирует ДНК по специфической последовательности нуклеотидов GAATTC. Вирусные ДНК после действия этого фермента расщепляются на отдельные фрагменты, число и размер которых могут быть анализированы с помощью электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях. В ДНК клеток животного происхождения после их расщепления рестрикционными эндонуклеазами методом электрофореза обнаружены дискретные зоны, содержащие фрагменты сателлитной ДНК (¹⁻⁴). Картина фрагментации ДНК высших растений нуклеазами рестрикции типа не изучена. Представляет интерес исследовать характер расщепления этих ДНК, поскольку в геном высших растений значительный вклад вносится со стороны ДНК пластид — хлоропластов и, в меньшей мере, митохондрий. ДНК хлоропластов с молекулярным весом 90 мегадальтон суперспирализована и имеет форму замкнутого кольца (⁵). По своим размерам эта ДНК близка к фаговым хромосомам и может быть подвергнута рестрикционному анализу.

В настоящей работе была изучена картина расщепления ДНК растений семейства бобовых — гороха (*P. sativum*), фасоли (*Ph. multifloris*), вики (*V. sativa*), чины (*L. sativus*) и бобов (*V. faba*) при действии рестрикционной эндонуклеазы *EcoRI*. Исследовано распределение полос в агарозном геле после гидролиза ДНК хлоропластов гороха (ХП-ДНК). Анализ данных дал основание полагать, что дискретные зоны в ДНК высших растений, обнаруживаемые методом электрофореза в агарозе, создаются фрагментами ДНК пластид.

Материал (листья или корни растений) растирали в жидком азоте и заливали буфером 0,1 *M* трис-НСl, 0,5 *M* сахарозой, 0,005 *M* MgCl₂, 0,05 *M* цитратом натрия, 0,001 *M* β-меркаптоэтанолом рН 8,2. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли. ДНК ядер выделяли из осадка после центрифугирования фильтрата при 100 *g* в течение 10 мин. по Мармуре (⁶), дополнив РНКазную обработку ДНК проназой.

Фракцию хлоропластов после центрифугирования надосадочной жидкости при 3000 *g* в течение 15 мин. подвергали дальнейшей очистке методом флотации и центрифугирования в ступенчатом градиенте концентрированных растворов сахарозы (60—45% + 15 мл. суспензии хлоропластов в 0,25 *M* сахарозном буфере). ДНК из очищенных хлоропластов выделяли указанным выше методом.

Для выделения эндонуклеазы *EcoRI* использовали штамм *E. coli* NM 182, полученный от доктора К. Мюррея и любезно предоставленный нам доктором В. И. Тавяниным. Фермент выделяли по методу Иопимори (⁷). Обработку ДНК проводили при 37° в условиях избытка фермента (2—5 раз) в течение 1 часа в буфере 0,1 *M* трис-НСl; 0,01 *M* MgCl₂; 0,006 *M* β-меркаптоэтанолу рН 7,5. Реакцию останавливали добавлением

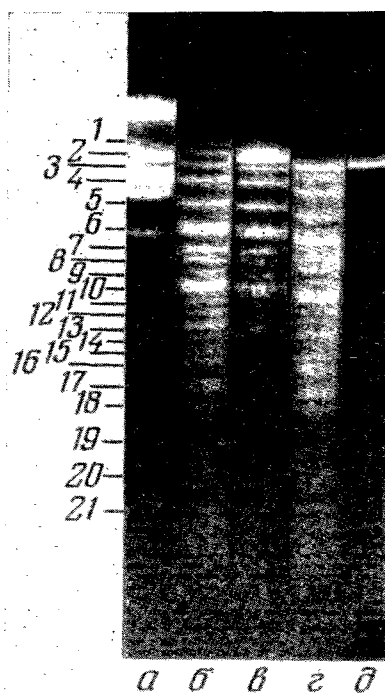


Рис. 1. Картина электрофоретического разделения фрагментов ДНК хлоропластов гороха в 1% агарозе после гидролиза эндонуклеазой EcoRI. *а* — ДНК фага λ , *б* — ХП-ДНК, *в, г* — два независимо выделенных препарата ХП-ДНК, обработанных нуклеазой вместе с ДНК плазмиды CoIE1, *д* — ДНК плазмиды CoIE1 после обработки ферментом EcoRI

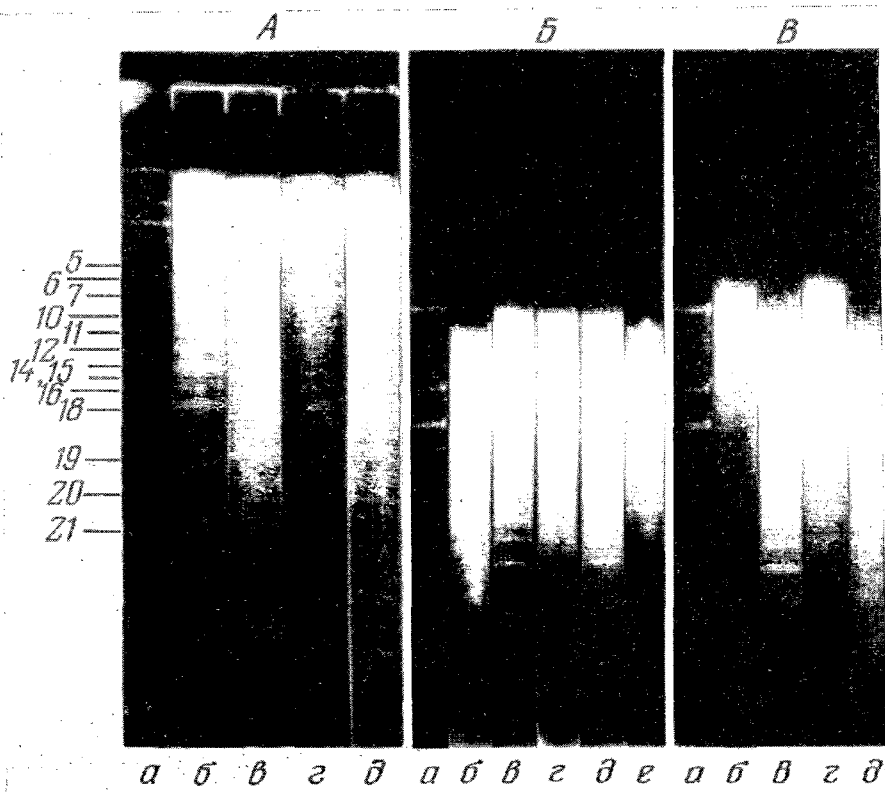


Рис. 3. Разделение фрагментов ДНК бобовых растений в 1% агарозе после гидролиза нуклеазой EcoRI. *А* — трубки 8×100 мм: *а* — ДНК фага λ , *б* — листьев фасоли, *в* — листьев чины, *г* — листьев вики, *д* — листьев бобов; *Б* — трубки 5,5×120 мм: *а* — ДНК фага λ , *б* — листьев гороха, *в* — листьев фасоли, *г* — листьев чины, *д* — листьев вики, *е* — листьев бобов; *В* — трубки 5,5×120 мм: *а* — ДНК фага λ , *б* — корней фасоли, *в* — листьев фасоли, *г* — корней гороха, *д* — листьев гороха

додецилсульфата натрия до 0,5% с последующим прогреванием при 50° в течение 10 мин. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили при 20° в 1% агарозе в стеклянных трубках (5,5×120 мм и 8×100 мм), при 50—60 в и токе 2,5 ма на трубку в течение 4 час. Агароза была приготовлена на электрофоретическом буфере (0,04 М трис-ацетат pH 8,2; 0,02 М Na-ацетат; 0,01 М ЭДТА, содержащем 0,4 мкг/мл этидиум-бромид). Агарозные гели докрашивали в течение 20 мин. в растворе этидиум-бромид (5 мкг/мл). Гели фотографировали в у.-ф. через красный фильтр (5,6×). Сканирование негативов осуществляли на регистрирующем микрофотометре ИФО-451. Для определения молекулярного веса фрагментов ДНК после гидролиза в качестве маркеров использовали ДНК фага λC1857, S7 и ColE1.

На рис. 1 представлена картина электрофоретического разделения фрагментов ХП-ДНК гороха после ее гидролиза EcoRI (б). На этом же рисунке (в и г) отмечены картины разделения двух независимо полученных препаратов ХП-ДНК, обработанных совместно с ДНК ColE1, на а и б — гидролизованные ДНК фага λ и плазмиды ColE1 соответственно. На фотографии видно, что после расщепления ХП-ДНК гороха в агарозном геле после электрофореза можно различить 21 полосу с разной интенсивностью свечения. Денситограмма негатива представлена на рис. 2. Из этого рисунка следует, что полосы 4, 5, 6, 7 и 10 значительно превосходят по интенсивности остальные зоны. Вероятнее всего, в этих зонах располагаются по нескольку фрагментов с близким по значению молекулярным весом, не разделенных друг от друга при указанном режиме электрофореза.

Определение молекулярных весов фрагментов в полосах проводили относительно положения в геле фрагментов λ_Е, λ_Г и ColE1, считая подвижность фрагментов пропорциональной логарифму их молекулярного веса (8) (табл. 1). Согласно определению, молекулярные веса фрагментов после гидролиза ХП-ДНК эндонуклеазой EcoRI лежали в пределах от 5,07 до 0,14 мегадальтон.

На рис. 3 (А, Б) представлены фотографии гелей, в которых проводилось разделение обработанных эндонуклеазой EcoRI ДНК листьев растений. На рис. 3А представлены гели из электрофорезных трубок 8×100 мм, на рис. 3Б, В—5, 5×120 мм. В последних трубках разделение было лучшим, но интенсивность свечения полос фрагментов с малым молекулярным весом меньше. В связи с этим на рис. 3Б видно более четкое разделение фрагментов относительно большого молекулярного веса. Из представленных рисунков видно, что ДНК бобовых растений расщепляется эндонуклеазой EcoRI с образованием фрагментов, дающих в электрофорезном геле дискретные полосы. Число различных полос после электрофореза в этих ДНК значительно превышает число полос, обнаруживаемое в ДНК животного происхождения (9). Наиболее четко зоны были видны в ДНК фасоли, несколько хуже в ДНК гороха. В ДНК вики и чины зоны менее заметны, чем в первых двух случаях, и слабо видны в ДНК бобов. В образцах ДНК вики и чины хорошо различалась полоса «ограниченной подвижности», обнаруженная в ДНК мыши (2) и подробно изученная на ДНК дрозофилы (4). Эта полоса образуется фрагментами ДНК высокого

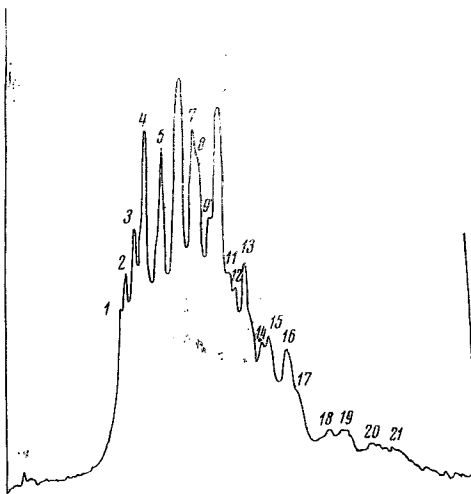


Рис. 2. Денситограмма разделения фрагментов ДНК хлоропластов гороха (1—21)

Таблица 1

Молекулярный вес фрагментов ДНК хлоропластов гороха после гидролиза
нуклеазой EcoRI

№ полосы	l/l_{CoIE1}	Мол. вес, 10^6 дальтон	l/l_{λ_E}	Мол. вес, 10^6 дальтон	l/l_{λ_F}	Мол. вес, 10^6 дальтон	Средний мол. вес, 10^6 дальтон
1	0,87	5,01	0,75	5,12	0,63	5,02	5,07
2	0,93	4,61	0,81	4,63	0,67	4,47	4,57
3	1,00	4,20	0,86	4,17	0,72	3,98	4,13
4	1,08	3,55	0,94	3,55	0,78	3,47	3,58
5	1,24	2,76	1,07	2,77	0,89	2,70	2,75
6	1,40	2,09	1,20	2,14	1,00	2,13	2,10
7	1,50	1,78	1,30	1,76	1,08	1,74	1,75
8	1,56	1,56	1,36	1,64	1,12	1,59	1,59
9	1,63	1,39	1,40	1,44	1,17	1,41	1,42
10	1,71	1,28	1,48	1,20	1,23	1,23	1,24
11	1,83	1,00	1,58	1,00	1,31	1,01	1,00
12	1,87	0,91	1,62	0,95	1,34	0,95	0,94
13	1,95	0,83	1,70	0,81	1,40	0,84	0,82
14	2,01	0,74	1,75	0,74	1,45	0,73	0,74
15	2,10	0,63	1,82	0,65	1,51	0,65	0,64
16	2,17	0,56	1,87	0,56	1,56	0,57	0,56
17	2,30	0,46	2,00	0,48	1,65	0,47	0,47
18	2,40	0,38	2,09	0,38	1,73	0,39	0,38
19	2,60	0,26	2,25	0,26	1,86	0,29	0,26
20	2,78	0,21	2,41	0,20	2,00	0,21	0,21
21	3,00	0,14	2,60	0,14	2,16	0,15	0,14

* Относительная подвижность фрагментов; l — расстояние от старта; l_{CoIE1} ; l_{λ_E} и l_{λ_F} — расстояние от старта до полосы линейной ДНК плазмиды CoIE1, E и F фрагментов гидролизованной ДНК фага λ .

Таблица 2

Молекулярный вес фрагментов ДНК бобовых растений после гидролиза
эндонуклеазой EcoRI

№ полосы в XII-ДНК	Мол. вес фрагментов XII-ДНК, 10^6 дальтон	Образец ДНК *							
		горох		фасоль		чина		вика	
		I	II	I	II	I	II	I	II
5	2,75	2,35	2,57	2,35	2,57	—	2,57	—	2,57
6	2,1	2,03	2,13	2,03	2,13	—	2,13	2,03	2,13
7	1,75	1,79	1,91	1,79	1,91	—	1,91	1,79	—
8	1,59	—	1,60	—	1,60	—	—	—	1,60
9	1,42	—	1,41	—	1,41	—	—	—	—
10	1,24	1,31	1,30	1,31	1,30	1,31	—	1,31	1,30
11	1,00	1, 2	1,1	1,02	1,1	—	—	—	1,1
12	0,94	0,91	0,98	0,91	0,98	—	—	—	—
13	0,82	0,84	0,92	0,82	0,92	—	—	—	0,92
14	0,74	0,72	0,80	0,72	0,8	—	—	0,72	—
15	0,64	0,66	—	0,66	—	—	—	—	—
16	0,56	0,54	—	0,54	—	0,54	—	0,54	—
19	0,26	0,24	—	0,24	—	0,24	—	—	—
21	0,14	0,11	—	0,11	—	0,11	—	0,11	—
Число совпадающих по мол. весу фрагментов	—	15		15		8		10	

* I — трубка 8×100 мм; II — трубка 5,5×120 мм.

молекулярного веса, относительно резистентной к действию рестрикционных эндонуклеаз вследствие часто повторяемых и простых последовательностей нуклеотидов. Интересно, что закономерности в характере рестрикционной картины ДНК животного происхождения в этом плане находят свое подтверждение на ДНК высших растений. Средние молекулярные веса фрагментов «ограниченной подвижности» были примерно одинаковы для ДНК вики, чины и фасоли и были равны 8,92 мегадальтон. Границы распределения молекулярных весов фрагментов ДНК определены из соответствующих денситограмм и лежали между этим значением и 0,1—0,16 мегадальтон, что примерно соответствует распределению ДНК животного происхождения.

Было проведено вычисление средних молекулярных весов фрагментов ДНК в полосах, различаемых на рис. 3А и Б. Данные сопоставлены со значением молекулярных весов фрагментов ХП-ДНК (табл. 2). Видно, что большинство фрагментов по своему молекулярному весу сходны с соответствующими фрагментами ХП-ДНК гороха. В ДНК гороха и фасоли насчитывалось 15 общих полос с ХП-ДНК гороха, в ДНК чины 8, а в ДНК вики 10. На основании этого можно думать, что, во-первых, наблюдаемые полосы содержат фрагменты в основном хлоропластного происхождения и, во-вторых, что рестрикционная картина ХП-ДНК разных видов в пределах семейства Fabaceae примерно одинакова. Эти данные служат в пользу представлений о разной скорости дивергенции нуклеотидных последовательностей ядерных и пластидных ДНК.

Разная степень интенсивности полос, вероятнее всего, связана с соотношением количеств ядерной и пластидной ДНК на 1 клетку. У бобов самое высокое среди рода *Vicia* содержание ДНК на 1 ядро⁽⁹⁾, и оно в 3 раза больше, чем у гороха⁽¹⁰⁾.

Картина фрагментации ДНК, выделенных из корней гороха и фасоли (рис. 3), приведена в сравнении с картиной ДНК листьев этих же растений. Видно, что в ДНК корней полосы значительно менее выражены, особенно в ДНК корней фасоли. Эти данные подтверждают предположение о том, что дискретные зоны соответствуют расположению фрагментов пластидных ДНК, так как в корнях вместо хлоропластов имеются в небольшом количестве пропластиды.

В работе могут быть сделаны следующие заключения: 1) ХП-ДНК гороха после гидролиза эндонуклеазой *EcoRI* расщепляется на фрагменты, образующие в агарозном геле при электрофорезе 21 полосу; 2) зоны, видимые в гидролизованных ДНК листьев бобовых растений, совпадают по своему положению с полосами ХП-ДНК, что указывает на их пластидное происхождение; 3) границы распределения фрагментов по их молекулярному весу в ДНК растений и наличие «фрагмента ограниченной подвижности» позволяют полагать, что характер распределения продуктов гидролиза *EcoRI* в ДНК животных и растений примерно сходен.

Авторы выражают благодарность В. И. Тацяшину за содействие, оказанное при выделении препарата фермента *EcoRI*.

Институт общей генетики,
Академии наук СССР
Москва

Поступило
13 X 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Botchan, G. McKenna, P. A. Sharp, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., v. 38, 383 (1974).
- ² E. M. Southern, G. Roizes, *ibid.*, v. 38, 429 (1974).
- ³ P. Philippsen, R. E. Streeck, H. G. Zachau, *Europ. J. Biochem.*, v. 45, 479 (1974).
- ⁴ D. H. Hamer, C. A. Thomas jr., *Chromosoma (Berl.)*, v. 49, 243 (1975).
- ⁵ R. Kolodner, K. K. Tewari, *J. Biol. Chem.*, v. 247, 6355 (1972).
- ⁶ J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, v. 3, 208 (1961).
- ⁷ R. N. Yoshimori, A Genetic and Biochemical Analysis of the Restriction and Modification of DNA by Resistance Transfer Factors. Ph. D. Diss., Univ. of California, San Francisco Medical Center, 1971.
- ⁸ R. B. Helling, H. M. Goodman, H. W. Boyer, *J. Virol.*, v. 14, 1235 (1974).
- ⁹ W. Y. Chooi, *Genetics*, v. 68, 195 (1971).
- ¹⁰ R. B. Flavell, M. D. Bennett et al., *Biochem. Genetics*, v. 12, 257 (1974).