



УДК 547.963.32:577.113.5

ЧАСТИЧНАЯ СТРУКТУРА САТЕЛЛИТНОЙ ДНК  
*CITRUS LIMON L.*

Беридзе Т. Г., Шенгелия Н. И.

Институт биохимии растений Академии наук ГССР, Тбилиси

Из суммарной сателлитной ДНК лимона выделена основная фракция, которая устойчива к действию значительного числа эндонуклеаз рестрикции, но расщепляется *BspI*. Определена первичная структура одного из *BspI*-фрагментов длиной 90 п. п. путем клонирования в бактериофаге M13mp9 с последующим секвенированием дидезокси-методом. В установленной нуклеотидной последовательности выявлено несколько элементов симметрии.

Геном эукариот наряду с уникальными и умеренно повторяющимися последовательностями содержит тандемно расположенные многократно повторяющиеся последовательности, обозначаемые как сателлитные ДНК. В ряде случаев стДНК удается обнаружить при равновесном ультрацентрифугировании фрагментированной клеточной ДНК в нейтральном градиенте плотности  $CsCl$ , в котором они занимают отдельную от основной массы ДНК полосу. В тех случаях, когда плотности стДНК и основной ДНК идентичны, их удается разделить в градиенте  $CsCl$  в присутствии некоторых антибиотиков или других низкомолекулярных ДНК-связывающих лигандов, а также в градиенте плотности  $Cs_2SO_4$  в присутствии ионов ртути или серебра [1]. В последнее время стДНК стали выделять при помощи эндонуклеаз рестрикции, подбор которых производится таким образом, чтобы они расщепляли основную массу ДНК, а стДНК оставалась интактной [2].

Количество стДНК варьирует в широких пределах, у некоторых видов она составляет более половины генома. Несмотря на значительное число работ, посвященных стДНК, их функциональная роль не выяснена. Известно, что они в основном локализованы в областях конститутивного гетерохроматина хромосом, каким-то образом определяя их компактную структуру [1].

стДНК разных видов эукариот различаются по многим параметрам — среднему содержанию G+C, длине повторяющихся единиц, последовательности оснований в повторах и т. д. Для выяснения функциональной роли стДНК необходимо, очевидно, выявить особенности химической структуры, которые придают им способность образовывать компактную структуру конститутивного гетерохроматина. Решить эту задачу, на наш взгляд, возможно при помощи компьютерного анализа нуклеотидной последовательности повторяющихся единиц стДНК, для чего необходимо знать первичную структуру стДНК разных систематических групп, в том числе и растений.

стДНК растений были обнаружены одновременно с стДНК животных, однако дальнейшее их исследование носило менее интенсивный характер. Нуклеотидная последовательность установлена лишь для нескольких стДНК (пшеницы, ячменя, кукурузы, однодольного растения *Scilla sibirica* [3–5]).

стДНК цитрусовых растений очень удобны для изучения. Во-первых, они составляют 20–25% генома цитрусовых; во-вторых, содержание в них G+C довольно высоко (65%), в результате их плавучая плотность значительно выше плавучей плотности основной ДНК, и они легко от-

Сокращения: стДНК — сателлитная ДНК; рДНК — рибосомная ДНК; мтДНК — митохондриальная ДНК; m<sup>5</sup>C — 5-метилцитозин.

Рис. 1. Распределение суммарной стДНК лимона: *а* – в нейтральном градиенте плотности CsCl; *б* – в градиенте плотности актиномицина D – CsCl (весовое соотношение актиномицина D – ДНК=0,5): *α* – митохондриальная ДНК, *β* – сателлитная ДНК, *γ* – рибосомная ДНК

Рис. 2. Распределение продуктов гидролиза стДНК эндонуклеазой *Bsp*I в 7,5% ПААГ. Стартовая линия обозначена буквой «С»

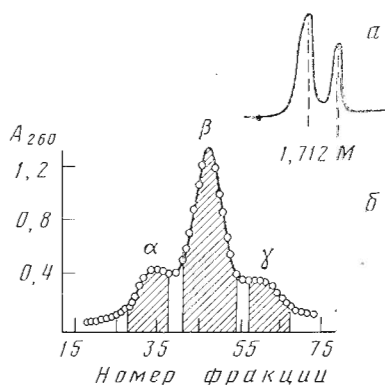


Рис. 1

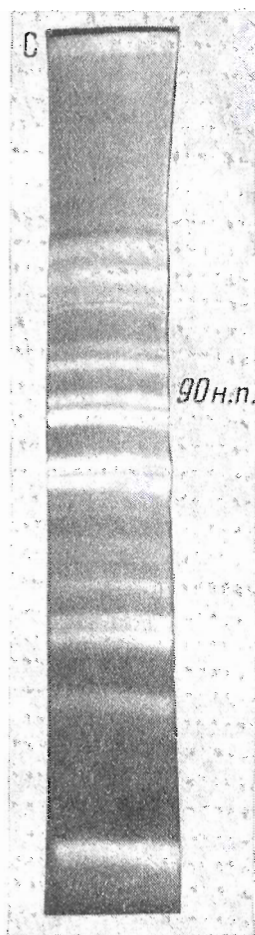


Рис. 2

деляются при ультрацентрифугировании в нейтральном градиенте плотности CsCl [6]. Однако митохондриальная и рибосомная ДНК лимона близки по значению плавучей плотности к стДНК. По этой причине они при фракционировании попадают в зону стДНК. В результате препараты стДНК, выделенные из суммарной ДНК лимона, содержат примеси рДНК и мтДНК. Их общее содержание в тотальном препарате стДНК не превышает 15–20% [7]. Эти три разные фракции удается препаративно разделить в градиенте плотности актиномицина D – CsCl (рис. 1).

стДНК лимона ( $\beta$ -фракция) устойчива к действию значительного числа эндонуклеаз рестрикции (*Alu*I, *Bam*HI, *Bgl*I, *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Hpa*II, *Sal*I, *Sma*I, *Xho*I). Однако она полностью расщепляется под действием *Bsp*I.

Один из *Bsp*I-фрагментов стДНК лимона (90 н.п., см. рис. 2) был элюирован из препаративного полиакриламидного геля и проклонирован в *Sma*I-сайте бактериофага M13mp9 [8]. Реципиентом для рекомбинантной ДНК служила *E. coli* K12 JM-103. Нуклеотидную последовательность инсерта в одноцепочечной рекомбинантной ДНК определяли дидезокси-методом Сенгера [9].

Ниже приведена нуклеотидная последовательность *Bsp*I-фрагмента сателлитной ДНК лимона длиной 90 н.п.:

```

1           10           20           30           40
CCGCSTTGAATCGTAATTCCATCGAGCGGCGGTAGAAATCCTTTG
      50           60           70           80           90
CAGACGACTTAAATACGCGACGGGTATTGTAAGTCCCAGAGTGG
  
```

Содержание G+C во фрагменте составляет 52,2%. В последовательности содержится 11 потенциально метилируемых сайтов [10]. Если допустить, что все они метилированы, то рассчитанное количество m<sup>5</sup>C (12,2%) близко к значению, определенному для стДНК лимона при помощи жидкостной хроматографии высокого давления (9,6–9,8%) (по данным А. Л. Мазина).

Установленную 90-нуклеотидную последовательность мы анализировали с помощью двумерного матричного метода [11] и обнаружили в ней четыре прямых повтора длиной 5 н. п. (GAATC в позициях 8–12 и 36–40, GGGTA в позициях 31–35 и 68–72, GCAGA в позициях 45–49 и 82–86, AGTGG в позициях 78–82 и 86–90), один совершенный палиндром (пентамер в позициях 1–5 и 28–32) и один несовершенный палиндром (декамер в позициях 52–61 и 70–80).

### Экспериментальная часть

стДНК листьев лимона (сорт Новогрузинский) выделяли по ранее описанному способу [7]. Препаративное разделение стДНК лимона на составные компоненты проводили центрифугированием в градиенте плотности актиномицин D—CsCl (весовое соотношение актиномицин D — ДНК составляло 0,5) в течение 72 ч при 30 000 об/мин (ультрацентрифуга Beckman L8-55, ротор 55 × Ti). Фракционирование осуществляли с помощью устройства фирмы «MSE» (Англия) при спектрофотометрическом (260 нм) контроле. Для удаления актиномицина D раствор ДНК диализовали против 0,01 М трис-HCl, 0,1 мМ EDTA (рН 8,0), затем экстрагировали дважды смесью хлороформ—изоамиловый спирт (24:1) до исчезновения поглощения в видимой области спектра.

Рестрикционный анализ проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *HpaII* (Boehringer, ФРГ) и *AluI*, *BglI*, *BglII*, *BspI*, *EcoRV*, *SalI*, *SmaI*, *XhoI*, которые были предоставлены Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР (Пушкино). стДНК гидролизовали в соответствующих буферных растворах при 37° С в течение 16 ч.

Гель-электрофорез продуктов расщепления стДНК осуществляли на пластине (16×18×0,2 см) с 7,5% ПААГ при 4° С и напряжении 8 В/см. Гель подкрашивали раствором бромистого этидия (1 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете (пленка РФ-3, или А-2, оранжевый светофильтр ЗС-2).

Препаративное разделение *BspI*-фрагментов стДНК проводили на пластине (20×40×0,3 см) с 7,5% ПААГ при напряжении 4 В/см в течение 16 ч. Фрагменты ДНК экстрагировали из геля раствором, содержащим 0,5 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , 0,01 М  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ , 1 мМ EDTA, 0,1% додецилсульфат натрия, 10 ч при 37° С и осаждали спиртом.

Клонирование и секвенирование *BspI*-фрагмента стДНК лимона проводили в системе бактериофага M13mp9 по прописи фирмы Amersham [12]. Реактивы, необходимые для клонирования и секвенирования в этой системе, были получены от фирмы Amersham (Англия). Вектор — репликативную форму M13mp9 — расщепляли рестриктазой *SmaI* и затем лигировали с анализируемым фрагментом. В качестве источника радиоактивности при определении структуры использовали [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (Amersham, Англия), 1500 Ки/ммоль.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Беридзе Т. Г. Сателлитные ДНК. М.: Наука, 1982, с. 120.
2. Pech M., Igo-Kemenes T., Zachau H. G. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 1, p. 417–432.
3. Dennis E. S., Gerlach W. L., Peacock W. J. Heredity, 1980, v. 44, № 1, p. 349–366.
4. Peacock W. J., Dennis E. S., Rhoades M. M., Pryor A. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 4, p. 4490–4494.
5. Deumling B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 1, p. 338–342.
6. Брагвадзе Г. П., Беридзе Т. Г. Биохимия, 1983, т. 48, № 3, с. 673–677.

7. Беридзе Т. Г. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 1, с. 126—135.
8. Messing J., Vieira J. Gene, 1982, v. 19, № 1, p. 269—276.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 75, № 10, p. 5463—5467.
10. Gruenbaum Y., Naveh-Manly T., Cedar H., Razin A. Nature, 1981, v. 292, № 5826, p. 860—862.
11. Maizel J. V., Lenk R. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 10, p. 7665—7669.
12. M13 Cloning and sequencing handbook. Amersham International plc., 1983.

Поступила в редакцию

23.V.1985

После доработки

3.VII.1985

## PARTIAL NUCLEOTIDE SEQUENCE OF SATELLITE DNA OF *CITRUS LIMON* L.

BERIDZE T. G., SHENGELYA N. I.

*Institute of Plant Biochemistry, Academy of Sciences of the  
Georgian SSP, Tbilisi*

The main fraction of the total satellite DNA from lemon proved to be resistant to a number of restriction endonucleases but was cleaved by *Bsp*I. A *Bsp*I-fragment 90 bp long was cloned in phage M13mp9 and sequenced by the dideoxy-method. Several elements of symmetry were observed in the elucidated sequence.