

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ В ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЕ ДНК ПРОРАСТАЮЩИХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

Р.Р.ВАРДАПЕТЯН, Г.А.МАКОСЯН, Г.А.АЙВАЗЯН, А.Б.КИРАКОСЯН,
В.ХЕМЛЕБЕН*

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии,

*Гиббинсский университет, Институт молекулярной биологии

Показано, что в процессе прорастания в геноме пшеницы происходит как увеличение среднего ГТ-содержания, так и повышение среднего уровня метилирования при относительно возрастании метилированных последовательностей типа "Ц↓" и "ГГ↓".

Մենսմանդանի և զարնի սնունդի ՄՀՏ-ի փոփոխվող կոմպոնենտը ընդունվում է փոփոխություններ, որոնք ծրայ են անում պրոսթիտում և հիբրիդի մեթիլացմանը: Սա և որով, որ ավելի զարնի միասնական և համապատասխան ՄՀՏ-ի Գ-ադենինացման միասնական և մեթիլացման միջին մեթիլացման: Միասնական մեթիլացման միջանկյալ տարբերակները համապատասխան փոփոխվում են զարնի մեթիլացման դեպքում:

Change of DNA helical structure of wheat embryos germinating on control medium was studied at the presence of gibberellin. It was shown that during germination had been appeared increasing of GC-contents of nuclear DNA and decreasing of average rate of methylation at simultaneous particular methylation of principle other site.

ДНК - рестрикционный анализ - зародыши пшеницы.

Целью настоящей работы являлось исследование изменений, происходящих в первичной структуре ДНК зародышей пшеницы при прорастании в присутствии ГК.

Материал и методы. Зародыши проращивали методом Джонстоуна и Черча [9] из семян пшеницы сорта белая 1 репродукции 1985 г. и проращивали на жизнеспособности [7]. Проращивание проводили в течение 3, 18, 24 ч при 20° в среде Риворза [10] в присутствии 10^{-4} М ГК.

Ядра из проращенных зародышей получали по методу Гоффинга и Босманской [4]. Контроль чистоты полученной ядерной фракции проводили окрашиванием эрином (5 мг/мл в 45 % укс.-к-те). К ядерному осадку добавляли 3-5 мл раствора протеиназы К (0,1 мг/мл) в Т7-буфере, содержащем 10 мМ Трис-HCl (pH = 8,0), 10 мМ DTTA, 1 мМ NaCl, 0,5 % SDS. Лизис проводили при 37° в течение 2-4 часов. Полученную суспензию центрифугировали 5 мин при 5000 г, осадок отбрасывали. Извлечения ядра не проводили против 2×2 л 0,025 М Na-бorateного буфера в течение ночи.

Для поддержания процента 8,3 г CsCl добавляли к 0,05 мл дналоты и доводили до оптической плотности 1,399 - 1,400. Лизис помещали в центрифугу Beckman T1 = 100 и центрифугировали при 105 000 г 48 ч при 20°. Центрифугат фракционировали на фракционирующем устройстве из 6 каналов на фракцию. Сепарирование конценраций ДНК проводили при 254 мМ. Интенсивность в каждой фракции определяли рефрактометром. Фракции, содержащие ДНК, отбирали, dialизировали в течение ночи (2×2 л буфера Т7 (10 мМ, pH = 7,5), добавляли 2 объёма 100 % этанола, осаждали ДНК (при 20°) и использовали для дальнейшего анализа. После сушки ДНК растворяли в течение ночи в 0,5 мл Т7-буфера. Из полученных растворов отбирали aliquоты ДНК по 50 мкл для дальнейшего рестрикционного анализа. Инкубацию проводили при 37° в течение 4 часов. Реакцию останавливали добавлением 5 мл смеси 50 % глицерина, 5 % SDS и 0,25 % бромфенолового синего.

Центрифуги промывали в 1-й серии [8]. В качестве стандартной порции взяты ЦНК фракции 1, отцентрифугированные в течение 10 мин при скорости вращения 21226, 5148, 4773, 4268, 3536, 2927, 1904, 1700, 1375, 947, 831, 564 пар. соответствующим. Как и в центрифуге при окраске, так и при элюировании (1,0 мл/ч течение 10 мин) в качестве стандартной ЦНК использовалась смесь (1,5 M NaCl + 0,5 M NaOH) в 1:1 соотношении с водой (0,5 M NaCl + 0,05 M Tris) на 1 час и проводили окрашивание ЦНК на ультрафиолетовом фоне при

В качестве стандарта для определения длины волны 80% растворили ЦНК (рННК), полученный из ЦНК [8], и отцентрифугировали и обработали рестрикционными

Методом ЦНК доказывает гибридность смеси и используется вместе с гидролизом смеси для определения термических характеристик. Гибридность проводили 24 ч при 70° [8].

Результаты и обсуждение В таблице приведены результаты центрифугирования ядерной ДНК каротинкой элиминации, происходящих в течение 3, 18, 24 ч в контрольной среде и в присутствии ГК. При выборе времени проращивания исходным из того, что включение меченых предшественников пуриновых кислот в ДНК в 18 часов достигает половины элиминации и в основном завершается к 24 часам [2]. Как видно из таблицы, в процессе проращивания наблюдается смещение максимумов ДНК в сторону высоких концентраций во всех случаях. Однако, если при проращивании в контрольной среде максимумы пиков ДНК обнаруживаются в полосах плотности CsCl 1,720 и 1,724 г/мл при проращивании в течение 3, 18, 24 ч соответственно, то в присутствии ГК максимумы пиков обнаруживаются в полосах плотности 1,716, 1,724 и 1,730 г/мл соответственно.

Таблица. Ультрацентрифугирование ядерной ДНК каротинкой элиминации в градиенте CsCl (приведены оптическая плотность (OD) фракции при $\lambda = 254$ нм)

Время проращивания	3 ч		18 ч		24 ч		
N фракции	CsCl	K	ГК	K	ГК	K	ГК
1	1,674	0,054	0,057	0,070	0,013	0,013	0,062
2	1,680	0	0,007	0,028	0,008	0,005	0,022
3	1,686	0,024	0,005	0,010	0,004	0	0,013
4	1,692	0,038	0	0	0,002	0,001	0,006
5	1,698	0,062	0,032	0,021	0,011	0,015	0,002
6	1,704	0,068	0,095	0,045	0,047	0,023	0,002
7	1,710	0,117	0,195	0,066	0,094	0,089	0,014
8	1,716	0,254	0,337	0,105	0,210	0,183	0,055
	1,720 *	0,355					
9	1,727	0,335	0,135	0,256	0,371	0,300	0,180
	1,724 *			0,336	0,407	0,327	
10	1,728	0,189	0,140	0,308	0,367	0,316	0,350
	1,730 *						0,407
11	1,734	0,101	0,087	0,203	0,206	0,240	0,395
12	1,740	0,068	0,065	0,133	0,094	0,150	0,256
13	1,746	0,054	0,055	0,098	0,049	0,086	0,132
14	1,752	0,046	0,052	0,080	0,027	0,050	0,067
15	1,758	0,042	0,042	0,070	0,020	0,031	0,031
16	1,764	0,040	0,037	0,066	0,011	0,023	0,019
17	1,770	0,038	0,032	0,059	0,006	0,018	0,012
18	1,776	0,038	0,032	0,056	0,004	0,018	0,014
19	1,782	0,038	0,037	0,056	0,002	0,021	0,019
20	1,788	0,040	0,047	0,055	0	0,025	0,024

21	1.794	6,080	6,462	0,763	0,007	6,035	0,048
----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Σ	1.642	1.522	1.741	1.529	1.615	1.616	
----------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--

* ОПП-пик получен из компьютерного анализа пикетной ОП отдельных фракций по специальной программе.

Из полученных результатов следует, что в течение первых трех часов разницы между седиментационными кривыми ДНК практически нет. Вероятно, в этот первоначальный период переход зародышей из состояния покоя к состоянию метаболической активности не сопровождается процессами модификации ядерной ДНК (амплификации, метилирования, реорганизировки и т.д.) [2].

Иная картина наблюдается при увеличении времени проращивания до 18 и 24 часов. Этот промежуток является периодом наибольшей ДНК синтезирующей и модифицирующей активности, предшествующей ключевому делению. Максимальное смещение наблюдается при проращивании в течение 24 ч в присутствии ГКЗ. Увеличение времени проращивания до 48 ч практически не отражается на седиментационных кривых.

Смещение максимума пиков в область более высоких концентраций CsCl₂ в процессе проращивания можно объяснить как увеличением среднего ГЦ-содержания [3], так и изменением уровня метилирования. Имеющиеся сведения об изменении уровня метилирования ДНК в процессе проращивания самые разные, а зачастую противоречивые. В настоящее время интерес к данному вопросу возрос в связи с признанием участия этого явления в процессах дифференциации и регуляции матричной активности хроматина [1,5].

Исследование уровня метилирования и ГЦ-содержания ДНК в процессе проращивания проводили с использованием рестриктаз Hpa II, Msp I, Bam HI и Eco RI. Выбор нуклеаз был обусловлен их способностью к гидролизу ГЦ-богатых участков, с одной стороны, и ингибированием этой активности при метилировании цитозина - с другой.

Результаты электрофореза обработанных нуклеазой ДНК, выделенных из прорастающих в течение 3 и 24 ч зародышей, показали, что различные препараты ДНК не в одинаковой степени подвержены действию рестриктаз. Если ДНК, выделенная из набухающих в течение 3 ч зародышей, была гидролизована в меньшей степени, то ДНК, выделенная из прорастающих 24 ч контрольных и обработанных тибберелином зародышей, оказалась в большей степени подверженной действию рестриктаз.

Из полученных отписков следует, что практически полный гидролиз ДНК рестриктазой Bam HI обусловлен отсутствием метилирования цитозина во всех соответствующих полинуклеотидных структурах. Об этом свидетельствует также различная степень гидролиза ДНК рестриктазами Hpa II и Msp I. Малая степень гидролиза ДНК рестриктазой Msp I, вероятно, обусловлена наличием большого количества МЦ+ГТ последовательностей в ГЦ-бедных участках ДНК. Об этом свидетельствует также высокая степень гидролиза ДНК рестриктазой Hpa II.

Новые результаты подтверждают полученные ранее данные о том, что при прарастании в почве споры начинают метаморфозироваться принципиально иным последовательным образом [1,5], что может быть обусловлено как появлением новых ДНК-менделеев, так и новых, доступных для метаморфозирования связей в хроматине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахчанян Б.Ф., Бахчанян Е.А., Фридрих А., Хачикян Л.А. Биохимия, 46,1, 47-54, 1981
2. Вартапетян Р.Р., Давтян Н.А., Тирадунян С.Г., Давтян М.А. Биолог. журн. Армения, 42, 12, 1064-1068, 1989
3. Вартапетян Р.Р., Давтян Н.А., Тирадунян С.Г., Давтян М.А. Фитопат. раст., 594, 1990
4. Гофштейн Л.В., Васильева Н.А. Докл. АН СССР, 187, 3, 696-700, 1966
5. Гроздецкий Л.Н., Сулейманова Г.К., Бахчанян Б.Ф. Мол. Физ., 10, 6, 1378-1386, 1976
6. Дроздовский А.Н., Сулейманова Г.К., Бахчанян Б.Ф. Вестн. 27-го государственного университета, Сер. биология и почвоведения, 4, 1975
7. Фридрих А.А. Жизнь и способности споры, М., 1978
8. Gopal V., Henschel V. Pl. Syst. Evol., 154, 63-77
9. Johanson L.B., Stern R., Nature (Lond), 173, 160-161, 1951
10. Rappaport J. The Bot. Review, 4, 1954

Получено 2.05.1991

Биол. журн. Армения, 2(48), 1995

УДК 577.21+579.852.5.11

О ГОМОЛОГИИ ДНК ЛАРВИЦИДНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS*

В.Г. ЧИЧЯН, Н.С. АМБАРИУМЯН, В.П. МЕЛИКСЕТЯН, Ж.Б. АКОНЯН,
Э.К. АФРИКЯН*

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван
*Институт микробиологии НАН Армении, Абовян

Проведен сравнительный анализ ларвицидных штаммов *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus thuringiensis*. Представлены физиолого-биохимическая и ларвицидная характеристики исследованных штаммов, а в качестве дополнительного критерия использован спектр электрофоретических ДНК исследованных штаммов. Высказано предположение о родстве ДНК культур указанных видов, ларвицирующих биопрепаратов ларвицидных насекомых.

Сравнительный анализ ларвицидных штаммов *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus thuringiensis*. Представлены физиолого-биохимическая и ларвицидная характеристики исследованных штаммов, а в качестве дополнительного критерия использован спектр электрофоретических ДНК исследованных штаммов. Высказано предположение о родстве ДНК культур указанных видов, ларвицирующих биопрепаратов ларвицидных насекомых.

A comparative study of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis* larvicidal strains has been carried out. The characteristics of physiological, biochemical and lentic properties have been presented. As an additional identification tool the DNA homology of the strains studied has been used.

Изучение гомологии ДНК ларвицидных бактерий.