

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДНК В ПРОЦЕССЕ СОЗРЕВАНИЯ АРАРАТСКОЙ КОШЕНИЛИ

М.Г. ХАЧАТРЯН*, А.Т. ХАЧАТРЯН*, Г.Г. КАРАГЕБАКЯН*,
Р.Р. ВАРДАПЕТЯН*, П.О. ВАРДЕВАНИАН**, А.Б. КИРАКОСЯН**,
В.Е. КАРАПЕТЯН***

*Институт молекулярной биологии НАН Армении, 375014, Ереван

**Ереванский государственный университет, кафедра биофизики, 375049

***Институт биохимии НАН Армении, 375014, Ереван

Араратская кошениль - ДНК - ГЦ - содержание

Известно, что экспрессия генома в клетках эукариот происходит под влиянием многих механизмов, включая делецию, амплификацию, реаранжировки и метилирование ДНК [8]. Если утрата генетического материала обнаружена только в некоторых эукариотических геномах [4], то амплификация генов свойственна всем эукариотическим клеткам при их дифференциации или трансформации [10].

В этом плане определенный интерес представляет исследование изменений, происходящих в первичной структуре ДНК в процессе онтогенеза насекомых. Он сопровождается выраженными формообразовательными процессами и является примером реализации закодированной в геноме последовательной клеточной дифференцировки. К сожалению, механизмы регуляции клеточной дифференцировки все еще мало изучены [7]. До сих пор неясно, что происходит с геномом дифференцирующихся клеток, в частности, изменяется ли он в процессе онтогенеза. Иными словами, неизвестно, отражается ли как-то реализация генетической программы онтогенеза на организации генома насекомых вообще и на структуре ДНК в особенности.

Изменение молекулярной популяции ДНК можно наблюдать не только на разных стадиях клеточного деления, но и на разных этапах развития многоклеточных организмов. Например, у *Drosophila melanogaster* в процессе эмбрионального развития изменяется содержание обогащенной АТ-парами сателлитной ДНК [3] и высокоповторяющихся повторов [2].

Араратская кошениль (*Porphyrophora Hamelii* Brandt) - эндемическое насекомое, ареал которого ограничивается Араратской долиной Армении. Оно представляет практический интерес из-за вырабатываемого им натурального красителя кармина, известного с древнейших времен. Таким образом, этот объект представляет интерес как с точки зрения эндемичности, так и рядом особенностей своего онтогенеза.

Целью настоящей работы являлось выделение ДНК из кошенили на разных стадиях его развития (личинка и взрослые самки) и проведение сравнительного анализа его среднего ГЦ - содержания и блочной

гетерогенности.

Материал и методика. Личинки и взрослые самки Араратской кошенили собирали соответственно в августе и октябре в заказнике Министерства охраны природы Армении в Армавирской области. До выделения их хранили при 4° в течение не более двух месяцев.

ДНК выделяли из изолированных нефракционированных клеточных ядер. Личинки и взрослые насекомые гомогенизировали при 4° в растворе, содержащем 0,3М сахарозы, 10 мМ Трис-НСl, 3 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ЭДТА, при pH 7,5. Гомогенат фильтровали для удаления хитиновых оболочек, центрифугировали при 5000 об/мин, осадок суспендировали в том же растворе и добавляли равный объем того же раствора, содержащего 0,5 мМ Triton X 100, и повторно центрифугировали. Ядерный осадок ресуспендировали в исходном буфере и добавляли SDS до конечной концентрации 1%. Полученный осадок растворяли в 5 мМ ЭДТА, обрабатывали РНКазой и повторно депротеинизировали. Полученную ДНК растворяли в 0,1 х SSC и диализировали в течение 2 суток против многократного избытка буфера.

Денатурацию ДНК осуществляли в термостатированных герметических кюветках спектрофотометра Ray-Uniscam SP 8-100 (Англия). Скорость плавления составляла 0,5° в линейной шкале. Дифференциальные кривые плавления строили по программе, описанной в работе [1], которая позволяет выявить пики на дифференциальной кривой плавления непосредственно из математического анализа исходной кривой. В таблице и на рисунке приведены усредненные результаты 6 экспериментов.

Результаты и обсуждение. Как известно, насекомые в процессе онтогенеза претерпевают ряд метаморфоз, которые сопровождаются (или вызываются) значительными изменениями генетического материала. Определенное участие в этом принимают гормоноподобные соединения типа эклизона [5], которые, синтезируясь на определенных стадиях, участвуют в количественных и качественных перестройках ядерной ДНК. Эти процессы могут сопровождаться как изменением среднего ГЦ-содержания, так и изменением числа и величины повторяющихся последовательностей в геноме [11].

На рис. 1 приведены кривые плавления ДНК кошенили, выделенные на стадиях т.н. цист и взрослых половозрелых самок. Как видно из рисунка, созревание кошенили сопровождается увеличением температуры плавления от 67,2° до 69,5°. Сдвиг температуры плавления в область высоких температур означает, что при созревании кошенили среднее ГЦ-содержание ее ДНК возрастает от 33,5 до 38,5%.

Известно, что ДНК практически всех эукариотических организмов состоят из блоков, последовательность пар нуклеотидов которых близка к случайной [6]. Эти блоки состоят из 10⁴-10⁵ пар оснований и могут существенно отличаться друг от друга по своему ГЦ-содержанию [9]. Определение среднего

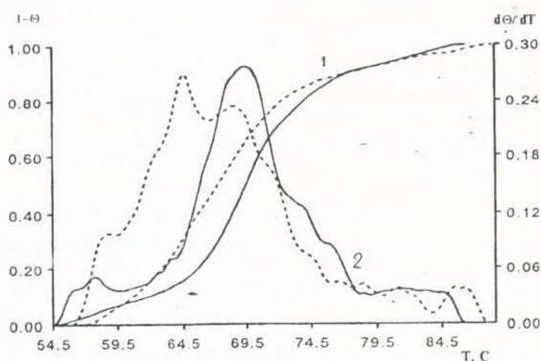


Рис. 1. Кривые плавления ДНК Араратской кошенили.

1 - кривые плавления ДНК, 2 - дифференциальные кривые плавления тех же образцов. Пунктиром показаны кривые для ДНК цист, сплошной линией - кривые ДНК взрослых самок.

ГЦ-содержания и температуры плавления не позволяет судить о количественных и качественных изменениях, происходящих в отдельных блоках ДНК. С целью более детального анализа полученных результатов нами были построены дифференциальные кривые плавления ДНК (рис. 1, кр. 2). Как видно из рис. 1, наряду с изменением среднего ГЦ-содержания наблюдаются значительные различия в структуре дифференциальных кривых плавления отдельных стадий. Расчетные значения средних ГЦ-содержаний отдельных блоков ДНК представлены в табл. 1.

Таблица 1. Среднее ГЦ-содержание и температуры плавления (Тм) отдельных блоков ядерной ДНК, выделенных из цист и взрослых половозрелых самок

Стадия цисты			Взрослые половозрелые самки		
доля, %	Тм	ГЦ-содерж., %	доля, %	Тм	ГЦ-содерж., %
6,30	58,4	15,2	6,05	57,8	13,9
38,90	63,8	26,4	13,20	63,4	25,6
45,23	69,8	38,9	72,97	70,3	40,0
6,30	80,5	61,2	7,78	82,3	64,9
3,27	86,5	73,7	-	-	-
100,0	67,2	33,5	100,0	69,5	38,3

Как видно из таблицы, переход из стадии цисты к стадии взрослых половозрелых самок сопровождается количественными и качественными изменениями в отдельных блоках ДНК. Если доля участков, плавящихся при температурах ниже 60°, практически не меняется и составляет 6,30 и 6,05%, то наблюдается существенное перераспределение участков, плавящихся в интервале 65-75°. Доля участков, плавящихся при 63,5°, резко уменьшается, от 38,9 до 13,2%, а плавящихся при 70°, наоборот, возрастает для исследованных стадий. Особый интерес представляет исчезновение при переходе от стадии цисты к стадии взрослой половозрелой самки участков, плавящихся при температуре 86,5°, с средним ГЦ-содержанием 73,7%, при одновременном увеличении среднего ГЦ-содержания ядерной ДНК от 33,5 до 38,5%.

Таким образом, из наших результатов следует, что переход от стадии цисты к стадии взрослых половозрелых самок сопровождается значительными перестройками в геноме араратской кошенили. Характер этих перестроек в исследованных, а также других стадиях развития араратской кошенили является предметом наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вардеванян П.О., Карапетян А.Т., Терзикян Г.А., Вардапетян Р.Р., Даниелян Э.А. Биополимеры и клетка. 6, 48-51, 1990.
2. Black W.C., Rai K.S. Genetical Research. 51, 185-190, 1988.
3. Crain W.R., Eden R.S., Pearson W.R., Davidson E.H., Britten R.J. Chromosoma, 56, 309-326, 1976.
4. Grosvik B.E., Raae A.J. Comp. Biochem. Physiol., 101, 407-411, 1992.
5. Korge G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4550-4554, 1975

6. *Lyubchenko Yu.S., Frank-Kamenetskii M.D., Vologodskii A.V., Lazurkin Yu.S., Gauss G.G.* Biopolymers, 15, 1019-1036, 1976.
7. *Moritz C., Uzzell T., Spolsky C., Hotz H., Darevsky I., Kuprianova L., Danielian F.* Genetica, 87, 53-62, 1992.
8. *Palmer M.J., Bantle J.A., Xiaoping Guo, Scott Fargo W.* Insect Molecular Biology, 3, 1, 57-62, 1994.
9. *Skowronski J., Furtak K., Klysik J.* Nucl. Acids Res., 5, 4077-4086, 1978.
10. *Vardevanian P.O., Panosyan G.H., Tiratsuyan S.G., Bağayan Yu.S., Vardapetyan R.R.* Studia Biophysica, 97, 209-212, 1983.
11. *Warren A.M., Crampton J.M.* Genet. Res. Camb., 58, 225-232, 1991.

Поступила 28.VIII.1997