



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(62), 2010

ՏԱՐԲԵՐ ՕՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ԴՆԹ-Ի ՀԱՄԵՄԱՏԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ ՖԼՅՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՑԻՆ ԱՆԱԼԻԶԻ ԵՂԱՆԱԿՈՎ

Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Լ.Հ. ՆԱՎԱՍԱՐԴՅԱՆ, Ս.Վ. ՄԱՐԴԻԹՅԱՆ,
Ա.Լ. ՆԱՎԱՍԱՐԴՅԱՆ

Երևանի պետական համալսարան, կենսաքիմիայի ամբիոն

Կատարվել է էուկարիոտ և պրոկարիոտ մի շարք օրգանիզմներից՝ հավի ճուփ արյան էրիթրոցիտներից, հորթի թիմուսից, խմորասնկերից, բակտերիաներից անջատված ԴՆԹ-ի ֆլյուորեսցենտային ցուցանիշների ուսումնասիրում՝ ԴՆԹ-ն տիտրելով էթիդիումի բրոմիդով: Ցույց է տրվել, որ պրոկարիոտ բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ն ավելի արագ է հագեցնում էթիդիումի բրոմիդով, քան էուկարիոտ բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ն: Ընդ որում, ստորակարգ էուկարիոտ խմորասնկային բջիջների ԴՆԹ-ն ավելի արագ է հագեցնում ներկանյութով, քան բարձրակարգ էուկարիոտների ԴՆԹ-ն: Հավա-նական է, որ այս տարբերությունները կապված են էվոլյուցիոն տեսանկյունից ԴՆԹ-ի կազմակերպման մակարդակի բարձրացման հետ և բնութագրում են ԴՆԹ-ի փաթեթա-վորման տարբեր մակարդակները հետազոտված բջիջներում:

Ֆլյուորեսցենցիա (էթիդիումի բրոմիդ) էուկարիոտ և պրոկարիոտ ԴՆԹ

Исследовались флюоресцентные показатели ДНК, выделенной из эукариотических и прокариотических организмов – из эритроцитов крови цыпленка, тимуса теленка, дрожжей и бактерий путем титрования ДНК бромистым этидием. Показано, что скорость насыщения бромистым этидием для про-кариотической ДНК выше по сравнению с эукариотической ДНК. При этом ДНК низших эукариот – дрожжей насыщается бромистым этидием быстрее, чем ДНК высших эукариот. Возможно, что эти различия связаны с повышением уровня организации ДНК в эволюционном аспекте и характеризуют различные степени упаковки ДНК в исследованных клетках.

Флюоресценция – бромистый этидий – эукариотическая и прокариотическая ДНК

The investigation of fluorescent parameters of DNA isolated from various eukariot and prokariot organisms – thymus, chicken erythrocytes, yeasts and bacteria, was implemented by titration of DNA with ethidium bromide. It has been shown that the speed of saturation of DNA with ethidium bromide is higher for prokariot cells, than for eukariots. Thus, DNA of the lower eukariots – yeasts, is saturated with ethidium bromide faster, than DNA of the higher eukariots. These distinctions are probably connected with increase in the level of the organization of DNA in evolution aspect and characterize various degrees of packing of DNA in the investigated cells.

Fluorescence – ethidium bromide – eukariot and prokariot DNA

Կենսաբանական մակրոմոլեկուլների կառուցվածքի ուսումնասիրման ժամանակակից ճշգրիտ մեթոդներից մեկը հանդիսանում է ֆյուորեսցենտային անալիզը: Այս մեթոդը թույլ է տալիս բացահայտել ուսումնասիրվող մոլեկուլների կառուցվածքային առանձնահատկությունները, ինչպես նաև կառուցվածքային փոփոխությունների ի հայտ գալը տարբեր ստրեսային գործոնների ազդեցության պայմաններում: ԴՆԹ-ի ֆյուորեսցենտային հատկությունների վերաբերյալ գրականության մեջ եղած տվյալները [3], ինչպես նաև մեր կողմից նախկինում ստացված արդյունքները [1,2], ցույց են տվել, որ ԴՆԹ-ն, գրգռվելով 280 նմ երկարության լույսով, տալիս է ֆյուորեսցենցիա, որի ինտենսիվությունը մոտ 3 կարգով ցածր է գրգռման ինտենսիվության համեմատությամբ: Այդ պատճառով ԴՆԹ-ի սեփական ֆյուորեսցենցիայի ուսումնասիրությունը էական ինֆորմացիա չի տալիս հետազոտվող համակարգերի կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ վիճակի մասին: Այս տեսակետից նուկլեինաթթուների ֆյուորեսցենտային ցուցանիշների ուսումնասիրման պրոցեսում ընդունված է օգտագործել ֆյուորեսցենտային զոնդավորման մեթոդը: Որպես ֆյուորեսցենտային զոնդ մեր կողմից ընտրվել է էթիդիումի բրոմիդը: Այն փոխազդում է ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալացիայի մեխանիզմով, այսինքն՝ ներդրվելով ԴՆԹ-ի երկշղթա պարույրի մեջ, որի արդյունքում փոխվում է ներկանյութի սեփական ֆյուորեսցենտային սպեկտրը:

Մեր աշխատանքի նպատակն է եղել պրոկարիոտ և էուկարիոտ բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ի ֆյուորեսցենտային ցուցանիշների ուսումնասիրումը՝ ԴՆԹ-ի լուծույթում էթիդիումի բրոմիդի քանակության աստիճանական բարձրացման պայմաններում, կամ, ինչպես ընդունված է անվանել այս մեթոդը գրականության մեջ, ԴՆԹ-ն տիտրելով էթիդիումի բրոմիդով:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտության օբյեկտ է հանդիսացել հետևյալ պրոկարիոտ և էուկարիոտ բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ն.

հավի ճտի արյան էրիթրոցիտներից անջատված ԴՆԹ (Reanal), որը լուծվել է 0.1xSSC-ում՝ 0.5 մգ/մլ կոնցենտրացիայով, հորթի թիմուսից անջատված ԴՆԹ, որը լուծվել է 0.1xSSC-ում՝ 0.5 մգ/մլ կոնցենտրացիայով, նավթային ածխաջրածիններ յուրացնող *C.guilliermondii* խմորասնկային բջիջներից անջատված ԴՆԹ:

E.coli վայրի տիպի բակտերիաներից անջատված ԴՆԹ: Բակտերիալ կենսազանգվածն ստացել ենք ՀՀ Ագրարային համալսարանի մոլեկուլային կենսաբանության և կենսատեխնոլոգիայի լաբորատորիայից:

Մտնդամիջավայրի պատրաստումը և խմորասնկային կենսազանգվածի ստացումը: Խմորասնկային բջիջներն աճեցրել ենք հեղուկ սնդամիջավայրում [1], թափահարող սարքի վրա (200-250 պտ/ր), որն ապահովում է անհրաժեշտ անրացիան, 4000 լք լուսավորության և 30° ջերմաստիճանի պայմաններում: 24-ժամյա ինկուբացիայից հետո խմորասնկային կենսազանգվածը կուլտուրալ միջավայրից առանձնացրել ենք ցենտրիֆուգման եղանակով՝ 4000 պտ/ր արագությամբ, 10 ր տոնոդությամբ (LL/TP-1): Խմորասնկային բջիջները թորած ջրով լվանալուց հետո որոշել ենք թաց կենսազանգվածի կշիռը:

Հետազոտված օբյեկտներից ԴՆԹ-ի անջատումը և մաքրումը: Խմորասնկային և *E.coli* բակտերիալ բջիջներից ԴՆԹ-ի անջատումն իրականացրել ենք Մարմուրի մեթոդի [5] մոդիֆիկացիայով [1]: Արդյունքում ստացել ենք մաքուր ԴՆԹ, որը համապատասխանում է մաքրության, նատիվության և պոլիմերության գրականությունից հայտնի չափանիշներին [4]:

ԴՆԹ-ի ֆյուորեսցենտային ցուցանիշների ուսումնասիրությունը կատարվել է FluoroMax™ ֆյուորեսցենտային սպեկտրոֆոտոմետրի օգնությամբ: Տվյալների մշակումը կատարել ենք DM3000F ծրագրի կիրառման միջոցով: ԴՆԹ-ի ուսումնասիրման համար մեր փորձերում որպես ֆյուորեսցենտային զոնդ օգտագործել ենք էթիդիումի բրոմիդը կամ 2.7-դիամինո-10-էթիլ-9-դիֆենիլֆենանտրիդիում բրոմիդը, ընդ որում ԴՆԹ-էթիդիումի բրոմիդ կոմպլեքսի գրգռման ալիքի երկարությունը կազմել է (≈510 նմ, իսկ առաքման ալիքի երկարությունը՝ (≈584 նմ [1]: Ուսումնասիրել ենք ԴՆԹ-ի ֆյուորեսցենտային ցուցանիշները ԴՆԹ-ի լուծույթում էթիդիումի բրոմիդի քանակության աստիճանական բարձրացման պայմաններում, կամ, ինչպես ընդունված է անվանել ուսումնասիրման այս եղանակը գրականության մեջ, ԴՆԹ-ն տիտրելով էթիդիումի բրոմիդով:

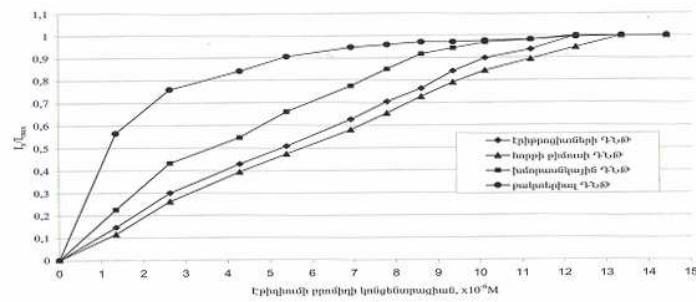
Արդյունքներ և քննարկում: Տարբեր օբյեկտներից անջատված ԴՆԹ-ի ֆյուորեսցենտային հատկությունների ուսումնասիրման արդյունքները ցույց են տվել, որ էթիդիումի բրոմիդի կոնցենտրացիայի աստիճանական բարձրացման պայմաններում դիտվում է ԴՆԹ-էթիդիումի բրոմիդ կոմպլեքսների ֆյուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճ՝ մինչև ներկանյութի որոշակի կոնցենտրացիան (աղ.1), որից հետո էթիդիումի բրոմիդի կոնցենտրացիան ավելացնելիս ֆյուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճ այլևս չի դիտվում:

ԴՆԹ-ի ֆյուորեսցենցիայի տվյալները համեմատելի դարձնելու նպատակով ստացված կորերը բերվել են նույն մասշտաբին, այսինքն՝ ֆյուորեսցենցիայի բացարձակ արժեքների փոխարեն դիտարկվել են նրանց հարաբերական մեծությունները՝ I_x/I_{max} (նկ.1):

Աղյուսակ 1. Տարբեր օրգանիզմներից անջատված ԴՆԹ-ի ֆյուտրեպենտային տիտրումը էթիդիումի բրոմիդով

C _{ԵԲ} , x10 ⁻⁶	C _{ԴՆԹ} , x10 ⁻⁵	C _{ԵԲ} : C _{ԴՆԹ}		Ֆյուտրեպենտային ինտենսիվությունը			
				Բակտերիալ ԴՆԹ, x10 ⁵ քվ/լ	Խմորա- սնկային ԴՆԹ, x10 ⁵ քվ/լ	Հորթի թի- մուսի ԴՆԹ, x10 ⁵ քվ/լ	Էրիթրո- ցիտոնե- րի ԴՆԹ, x10 ⁵ քվ/լ
1.19	7.75	0.015	1:66.6	0.96(0.08)	0.6(0.05)	0.22(0.01)	0.82(0.08)
4.65	7.57	0.060	1:16.6	1.54(0.12)	3.20(0.2)	0.81(0.03)	3.03(0.2)
5.76	7.51	0.077	1:12.9	1.61(0.13)	3.90(0.1)	1.05(0.09)	6.87(0.3)
6.87	7.45	0.097	1:10.3	1.63(0.11)	4.50(0.2)	1.21(0.08)	4.18(0.2)
7.95	7.39	0.107	1:9.3	1.65(0.08)	4.86(0.11)	1.3(0.11)	4.57(0.24)
9.02	7.34	0.123	1:8.1	1.65(0.09)	5.00(0.09)	1.5(0.09)	4.82(0.19)
10.08	7.29	0.138	1:7.3	1.66(0.11)	5.14(0.3)	1.6(0.11)	5.01(0.25)
11.11	7.23	0.150	1:6.6	1.67(0.12)	5.20(0.1)	1.7(0.07)	5.11(0.18)
12.13	7.18	0.169	1:5.9	1.69(0.05)	5.30(0.2)	1.8(0.1)	5.12(0.17)

Տանդազրություն. C_{ԵԲ}-ն էթիդիումի բրոմիդի կոնցենտրացիան լուծույթում, C_{ԴՆԹ} ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիան լուծույթում, C_{ԵԲ}: C_{ԴՆԹ}՝ էթիդիումի բրոմիդի և ԴՆԹ-ի խտությունների հարաբերակցությունը:



Նկ. 1. Տարբեր օրգանիզմներից անջատված ԴՆԹ-ի և էթիդիումի բրոմիդի կոմպլեքսի ֆյուտրեպենտային ինտենսիվության կախումը ներկանյութի կոնցենտրացիայից (մասշտաբավորված կոր)

Հազեցման կորերի մաթեմատիկական վերլուծություն կատարելիս ընդունված է աշխատել առավելագույն մեծության q արժեքի հետ, ուստի ստացված տվյալների քննարկման համար ևս ընտրել ենք I_0/I_{max} մեծության q արժեքը և դիտարկել այդ արժեքին բնորոշ էթիդիումի բրոմիդի կոնցենտրացիաները: Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ էթիդիումի բրոմիդի այն կոնցենտրացիան, որը բնութագրում է հավի ճտի արյան էրիթրոցիտներից անջատված ԴՆԹ-ի մոլեկուլի հետ ներկանյութի կապման կիսահազեցման վիճակը (աղ. 2), կազմում է 6×10^{-6} M, իսկ C_{ԵԲ}:C_{ԴՆԹ} հարաբերությունը՝ 1:12, այսինքն՝ ԴՆԹ-ի կիսահազեցումն էթիդիումի բրոմիդով տեղի է ունենում այն պայմաններում, երբ ԴՆԹ-ի 12 զույգ նուկլեոտիդին համապատասխանում է լուծույթում ներկանյութի 1 մոլեկուլ: Հորթի թիմուսից անջատված ԴՆԹ-ի ֆյուտրեպենտային ցուցանիշների ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ ԴՆԹ-ի հազեցումն էթիդիումի բրոմիդով տեղի է ունենում ներկանյութի կոնցենտրացիայի 5.45×10^{-6} M արժեքի կամ C_{ԵԲ}:C_{ԴՆԹ}=1:12.5 հարաբերության դեպքում: Այսպիսով, էուկարիոտ օրգանիզմներից անջատված բարձրամոլեկուլային ԴՆԹ-ի ֆյուտրեպենտային ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ ԴՆԹ-ի կիսահազեցումը ներկանյութով տեղի է ունենում լուծույթում էթիդիումի բրոմիդի այն կոնցենտրացիայի պայմաններում, երբ ներկանյութի 1 մոլեկուլին համապատասխանում է ԴՆԹ-ի 12 զույգ նուկլեոտիդ:

Աղյուսակ 2. Տարբեր օբյեկտներից անջատված ԴՆԹ-ի ֆյուորեսցենտային ցուցանիշները

Տարբերակ, ԴՆԹ	Ֆյուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը $\times 10^3$ քվ/վ	Էթիդիումի բրոմիդի կոնցենտրացիան	
		$C_{էթ}, \times 10^{-6} M$	$C_{էթ}:C_{ԴՆԹ}$
Հավի ճտի արյան Էրիթրոցիտների	1.09 (0.03)	6.0(0.05)	1:12
Հորթի թիմուսի	0.99(0.01)	5.45(0.03)	1:12.5
Խմորասնկային	2.34 (0.02)	3.49(0.03)	1:18
Բակտերիալ	1.05(0.01)	1.77(0.01)	1:43

Խմորասնկային բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ի ֆյուորեսցենտային ցուցանիշների ուսումնասիրության արդյունքները ցույց են տվել, որ Էթիդիումի բրոմիդի այն կոնցենտրացիան, որը բնութագրում է խմորասնկային ԴՆԹ-ի հետ ներկանյութի կապման կիսահազեցման վիճակը, կազմում է $3.49 \times 10^{-6} M$ (նկ.1), իսկ $C_{էթ}:C_{ԴՆԹ}$ հարաբերությունը՝ 1:18, այսինքն՝ ԴՆԹ-ի կիսահազեցումն Էթիդիումի բրոմիդով տեղի է ունենում այն պայմաններում, երբ ԴՆԹ-ի 18 զույգ նուկլեոտիդին համապատասխանում է լուծույթում ներկանյութի 1 մոլեկուլ:

Աշխատանքի հաջորդ փուլում իրականացվել է պրոկարիոտ բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ի ֆյուորեսցենտային հատկությունների համեմատական ուսումնասիրում: Հետազոտության օբյեկտ են հանդիսացել մարդու աղիքային միկրոֆլորայի *E.coli* վայրի տիպի բակտերիալ բջիջները: Ինչպես ցույց են տվել ստացված տվյալները, պրոկարիոտ ԴՆԹ-ի դեպքում ևս, ինչպես էուկարիոտ ԴՆԹ-ի տարբերակում, Էթիդիումի բրոմիդի կոնցենտրացիայի աստիճանական բարձրացման պայմաններում բարձրանում է ֆյուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը, ընդ որում՝ ԴՆԹ-ի հազեցումը ներկանյութով տեղի է ունենում հետևյալ պայմաններում. ներկանյութի կոնցենտրացիան կազմում է $1.77 \times 10^{-6} M$, իսկ $C_{էթ}:C_{ԴՆԹ}=1:43$:

Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ պրոկարիոտ բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ն ավելի արագ է հազեցում Էթիդիումի բրոմիդով, քան էուկարիոտ բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ն: Ընդ որում, էական տարբերություններ են դրսևորվում նաև բարձրակարգ և ստորակարգ էուկարիոտ բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ի ֆյուորեսցենտային պատկերում. ստորակարգ էուկարիոտ խմորասնկային ԴՆԹ-ն ավելի արագ է հազեցում ներկանյութով, քան հավի ճտի արյան Էրիթրոցիտներից անջատված ԴՆԹ-ն, իսկ հորթի թիմուսից և հավի ճտի արյան Էրիթրոցիտներից անջատված ԴՆԹ-ի դեպքում այդ տեսակետից էական տարբերություններ չեն դրսևորվում: Հավանական է, որ այս տարբերությունները կապված են էվոլյուցիոն տեսանկյունից ԴՆԹ-ի կազմակերպման մակարդակի բարձրացման հետ և բնութագրում են ԴՆԹ-ի փաթեթավորման տարբեր մակարդակները հետազոտված բջիջներում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Навасардян Л.А., Давтян М.А., Марутян С.В.* Влияние рентгеновского облучения на ДНК одноклеточных организмов: 1-Флюоресцентные исследования. МАНЭБ, 6, стр.53-55, 2001.
2. *Навасардян Л.А., Давтян М.А., Марутян С.В.* Изменение флюоресцентных показателей ДНК дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4 под влиянием рентгеновского облучения и репарации. 2 Межд. симпозиум “Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии. Труды”, Москва-Дубна, 2, стр.121-125, 2002.
3. *Юденфренд С.*, Флюоресцентный анализ в биологии и медицине, изд-во Мир, М., 1965.
4. *Britten R.J., Graham D.E., Neufeld B. R.*, In: Methods in enzymology, N.Y., Acad.Press, 1974.
5. *Marmur J. J.* Mol.Biol., 3, p.208, 1961.

Ստացվել է 25.02.10