

На правах рукопису

КУНЦЕВИЧ Вікторія Ігорівна

УДК 547.963.3.

СКЛАДНІСТЬ НУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ мРНК

ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНІВ СОНЯШНИКА

(*Helianthus annuus* L.)

03.00.04 - біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1994

Ав 31, 666

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біохімії рослин
Інституту фізіології рослин та генетики НАН України (м. Київ)

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
ЛЮБОВ Віктор Павлович

Офіційні консультанти: доктор біологічних наук, професор
ВОЯЦІЦЬКИЙ Володимир Михайлович

доктор біологічних наук
МАЛУТА Станіслав Станіславович

Провідна організація: Інститут експериментальної ботаніки
ім. В. Ф. Купрєвича АН Белорусі

Захист дисертації відбудеться 25.01.1995 року
о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 01.01.07 для захисту дисертацій на біологічному
факультеті Київського університету ім. Тараса Шевченка
за адресою: м. Київ, проспект Глушкова, 2, корп. 12.

ПОШТОВА АДРЕСА: 252033, Київ-33, вул. Володимирська 64,
спецрада Д 01.01.07,
біологічний факультет.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці університету.

Автореферат розіслано 22.12. 1994р.

Вчений секретар спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук, професор *Брайон* О. В. БРАЙОН

ЛННБ ім. В. Стефаника
АН України

ЛННБ України ім. В. Стефаника

00756196 (Y)

Актуальність і ступінь дослідженості тематики дисертації. Вивчення диференціальної активності генів в процесі індивідуального розвитку рослин є одним з фундаментальних напрямків сучасної біології. Подальший розвиток біохімічних та генно-інженерних методів зумовив інтенсивні дослідження на молекулярному рівні окремих індивідуальних генів та відповідних матричних РНК, визначення їх первинних структур. Однак характеристика експресії одного чи декількох генів не дає уяви про функціонування всього геному, як єдиної, у вищій мірі організованої структури. Практично відсутні роботи по регуляції експресії генетичної інформації рослин на посттранскрипційному рівні.

Внаслідок того, що регуляція експресії геному обумовлює функціонування певного набору структурних генів, необхідних для конкретного етапу розвитку багатоклітинного організму, один із аспектів вирішення цієї багатогранної проблеми пов'язаний з аналізом кінетичної складності нуклеотидних послідовностей мРНК та їх попередників (кінетична складність нуклеотидних послідовностей - це сума довжин фрагментів всіх видів (по одній послідовності кожного виду)). Для вищих рослин така оцінка матричних та ядерних РНК у морфогенезі до сьогоднішнього часу проведена лише для тютюну [Goldberg R. B., 1988]. До того ж, вивчення регуляції експресії рослинного геному на транскрипційному і посттранскрипційному рівнях потребує наявності даних про структуру самого геному. Це зумовило обрання об'єктом дослідження соняшник (*Helianthus annuus* L.), для якого детально проаналізовані особливості структури геному, проведена оцінка кінетичної складності нуклеотидних послідовностей тотальної ДНК та окремих компонентів геному [Лобов В. П., Тищенко Е. Н., 1984]. Такі дані надають можливість оцінити складність популяцій яРНК та мРНК. В свою чергу, порівняння складностей нуклеотидних послідовностей яРНК різних органів, з одного боку, та співставлення їх зі складностями нуклеотидних послідовностей мРНК, що транскрибуються в цитоплазмі клітин, з іншого, дають загальну уяву як про диференціальну активність генів, так і про наявність регуляції експресії геному на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях.

Мета та основні завдання дослідження. Метою роботи була оцінка диференціальної активності генів в процесі морфогенезу соняшника. У зв'язку з цим були поставлені такі завдання:

1. Виділити полісоми, полісомну РНК із дводенних етиольованих паростків, коренів 5-денних етиольованих паростків та 20-22 денних перших справжніх листків.

2. Виділити унікальні послідовності ДНК соняшника і визначити складність нуклеотидних послідовностей полісомної РНК органів, що вивчаються.

3. Оцінити складність нуклеотидних послідовностей органоспецифічних полісомних РНК.

4. Виділити ядра і ядерну РНК паростків та коренів.

5. Провести порівняльний аналіз складностей нуклеотидних послідовностей ядерних та полісомних РНК паростків та коренів.

Наукова новизна досліджень. Вперше досліджено полісомні мРНК вегетативних органів соняшника. Виявлено, що складність мРНК паростків і листків цієї культури у 4.4 рази перевищує складність мРНК коренів. Таким чином, вперше встановлена кількісна варіабельність складності нуклеотидних послідовностей полісомних мРНК соняшника. Показана наявність органоспецифічних мРНК в цитоплазмі клітин коренів і листків соняшника, дана їх кількісна оцінка. Вперше оцінена складність популяцій ядерних РНК в паростках і коренях соняшника. Показано, що суттєва різниця у складності популяцій мРНК паростків і коренів є наслідком процесів, що відбуваються на транскрипційному і посттранскрипційному рівнях регуляції експресії генів соняшника.

Теоретична та практична цінність дослідження. Результати досліджень свідчать про те, що модель органоспецифічної регуляції експресії геному на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях, створена на основі досліджень, виконаних на рослинах тютюну (Kamalay and Goldberg, 1984; Goldberg, 1986) не є універсальною. Регуляція експресії геному соняшника на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях здійснюється по дещо іншому типу. Отримані дані поглиблюють уявлення про диференціальну активність генів в онтогенезі вищих рослин, можуть бути використані при створенні сучасної теорії індивідуального розвитку рослин, стати теоретичною базою для ство-

рення генно-інженерними методами нових сортів сільсько-господарських рослин, поліпшення властивостей існуючих культур.

Реалізація та впровадження наукових розробок. Робота виконана по завданню 10.Н2 цільової науково-технічної програми О.74.05, по проблемі 5.1.1.4 КП НТП і пов'язана в планом науково-дослідних робіт відділу по темі 2.3.6.230.

Апробація результатів наукових досліджень. Матеріали дисертації доповідались на II з'їзді Всеукраїнського товариства фізіологів рослин (Мінськ, 1990), VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), II з'їзді Українського товариства фізіологів рослин (Київ, 1993).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 9 робіт.

Структура та обсяг дисертаційної роботи. Дисертація складається із вступу, 5 розділів, узагальнення та висновків, викладена на 109 сторінках машинописного тексту, до якого входять 11 малюнків, 4 таблиці. Список літератури становить 149 джерел, з яких 101 іноземне.

На захист виносяться:

1. Дані щодо оцінки кінетичної складності нуклеотидних послідовностей полісомних та ядерних РНК вегетативних органів соняшника.

2. Результати порівняльного аналізу складностей всього геному, фракції унікальних послідовностей ДНК, яРНК, полісомних РНК, органоспецифічних мРНК, які свідчать про наявність регуляції експресії генів на рівні транскрипції і відображають диференціальну активність генів в процесі морфогенезу соняшника.

Особистий внесок дисертанта у розробку наукових результатів. Дисертантом разом з науковим керівником були окреслені мета і завдання досліджень, самостійно проаналізовано і узагальнено результати досліджень. Отримані дані обґрунтовані теоретично, зроблені відповідні висновки, що відображено в дисертації та літературі.

Дисертант висловлює вдячність о. н. с., к. б. н. О. М. Тищенко, в науковій групі якої були отримані результати досліджень.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження були полісомні та ядерні РНК 2-денних етиолованих паростків, коренів 5-денних етиолова-

них паростків та 20-22-денних перших справжніх листків соняшника сорту Передовик. Паростки вирощували в рулонах фільтрувального паперу на дистильованій воді в термостаті при $t=26-28^{\circ}\text{C}$. Для отримання перших справжніх листків рослини вирощували у вегетаційних посудинах, в ґрунтовій культурі в теплицях при нормальному рівні освітлення.

ДНК виділяли із 7-денних етиологованих паростків соняшника за методикою, що описана раніше [Лобов В. П., 1984]. Щоб відокремити одно- та дволанцюгову ДНК використовували гранульований оксиапатит, синтезований за методом Мавіна А. А. [1975]. Щоб отримати унікальні послідовності ДНК соняшника сумарний очищений препарат ДНК попередньо фрагментували ультразвуком з частотою 22 кГц на УЗДН-1 в 0,12 М ФБ (фосфатний буфер-еквімолярний розчин NaH_2PO_4 та Na_2HPO_4), рН 6,8 при 4°C на протяві 180 секунд і два рази реасоціювали ДНК до $\text{Cot } 100$ (добуток первісної концентрації ДНК та часу інкубації, виражений в моль \cdot с/л.). Надалі, унікальні послідовності ДНК, що зв'язалися з оксиапатитом, елюювали 0,5 М ФБ при 60°C та мітили методом нік-трансляції за рекомендаціями фірми Amersham і відокремлювали обернені повтори за методом Moysis R. K. [1981]. Активність фракції вимірювали в оцинтиляційній рідині ЖС-8 на лічильнику Isosap-300.

З метою відокремлення із розчинів сахарози можливих білкових домішок, зокрема активних ферментів, буфери, що містили сахарозу, обробляли за допомогою ДЕАЕ-целюзови.

Полісоми виділяли за модифікованим методом [Jackson A. D., 1976]. Якість препаратів полісом контролювали по спектральним показникам та по седиментограмам, реєструючи оптичну щільність ультрафіолетовим фотометричним детектором (СКБ, РАН). Препарат полісом розділяли в 15%-45% градієнті сахарози, відбирали фракцію з коефіцієнтом седиментації більш ніж 100S, обробляли ЕДТА і відокремлювали фракцію полісом з коефіцієнтом седиментації менш ніж 80S. Полісомну РНК виділяли за модифікованим методом [Любимова Е. В., 1977]. Концентрацію та рівень чистоти РНК та ДНК визначали вимірюванням оптичної щільності розчинів на спектрофотометрі Specord M-40.

Ядра із паростків та коренів виділяли за модифікованим методом Іскакова В. К. [1988]. Якість препарату контролювали під

мікроскопом. Підрахунок ядер проводили в камері Горяєва. Ядра фарбували оцтовокислим миш'яком. Для отримання ядерної РНК використовували метод Маніатіса Т. [1984], дещо модифікований нами на етапі лізису ядер.

³H-нуль-мДНК паростків соняшника відокремлювали за методикою [Katalay J. C., 1980]. Гібридизацію УП ДНК в РНК проводили в 1 М NaCl, 0,01 М ФБ, 0,005 мМ ЕДТА при 66°C до необхідних значень Rot (добуток первісної концентрації РНК та часу інкубації, виражений в моль·л/с). Фракцію гібридних молекул ДНК:РНК визначали за допомогою хроматографії на колонках з оксиапатитом. Для кожного значення Rot оцінювали величину самореасоціації ДНК. Результати досліджень оброблялись статистично [Зайцев Г. Н., 1973].

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ІХ ОБГОВОРЕННЯ .

1. Виділення полісом і полісомної РНК в паростків, листків та коренів соняшника. Основні труднощі при отриманні препаратів будь-якої РНК - це усунення рибонуклеазної активності як під час виділення, так і на подальших етапах досліджень. Окрім цього, конкретні завдання досліджень та біохімічні особливості кожного окремого виду організмів ставлять додаткові вимоги щодо методичних підходів. Так, виділення РНК із різних органів соняшника було пов'язано не лише з інактивацією РНКаз, а й з максимальною очисткою РНК від білків і полісахаридів. Крім того, виходячи з кінцевої мети дослідження, необхідно було відокремити мРНК, що транскрибуються в цитоплазмі, від домішок ядерної РНК та ДНК.

Виходячи з цього, на перших етапах досліджень виділяли полісоми із паростків, коренів та листків соняшника, із яких потім і отримували препарати РНК. За основу був взятий метод [Jackson A. D., 1976] дещо модифікований нами. Зокрема, враховуючи наявність в органах соняшника активної поліфенолоксидази, в буфер для гомогенізації вводили антиокислювач - аскорбінову кислоту. Окрім цього, наша модифікація передбачала додавання до постмітохондріального супернатанту клітинного лізату неіонного детергента з метою екстракції мембранно-зв'язаних полісом. Як наслідок, вихід сумарного препарату дорів-

нював для паростків - 0,9-1,1 мг/г, а для листків та коренів відповідно 0,4-0,6 мг/г та 0,3-0,4 мг/г тканини. На рис. 1 наведений профіль седиментації полісом, виділених з паростків. Як видно із седиментограми, ми одержували полісомний препарат високої якості: чітко виявлялися піки, що відповідають моно-, ди-, три-... і, навіть, декасомам. Частка нуклеопротеїдів із коефіцієнтом седиментації більше ніж 100 S (не деградовані полісоми) дорівнювала в препаратах 50-80%. З метою очистки полісом від ядерних домішок фракцію I (рис. 1) обробляли ЕДТА і розділяли в градієнті сахарози. На рис. 2 наведений профіль седиментації полісом, що оброблені ЕДТА. Чітко розрізняються два піки із коефіцієнтами седиментації менше ніж 80 S, тому що після обробки ЕДТА полісоми дисоціюють на субодиниці, в той час як на седиментограмах полісом, що не були оброблені, розрізняється до 10 піків. Відсутність високомолекулярних піків на седиментограмах полісом, оброблених ЕДТА, свідчила про відсутність рибонуклеопротеїдів ядерної природи, виходячи із чого фракцію II (рис. 2) полісом із коефіцієнтом седиментації менше ніж 80S використовували для виділення сумарної полісомної РНК, коефіцієнти чистоти якої становили по полісахаридах $OG_{250}/OG_{230} > 2$, а по білках $OG_{250}/OG_{280} = 1,9$.

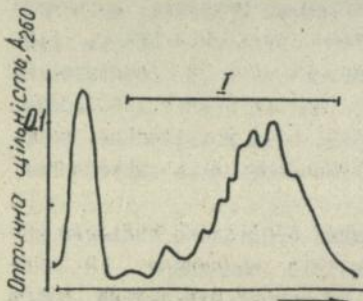


Рис. 1. Типовий профіль седиментації полісом паростків в градієнті сахарози.

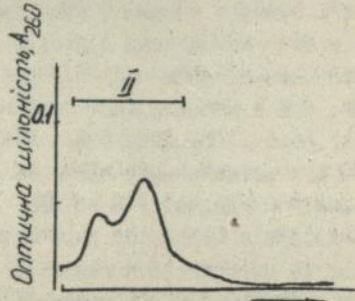


Рис. 2. Типовий профіль седиментації полісом після обробки ЕДТА.

Таким чином, застосування модифікованих нами методів [Jackson A. O.] та [Любимова Е. В.] дозволяло отримувати високоякісні препарати недеградованих полісом та виділяти в них

чисті, позбавлені ядерних домішок препарати РНК, які можна використовувати в дослідях з молекулярної гібридизації.

2. Виділення унікальних послідовностей ДНК сояшника. Щоб оцінити кінетичну складність нуклеотидних послідовностей полісомної і ядерної РНК методом молекулярної ДНК/РНК гібридизації необхідно було отримати препарати унікальних послідовностей ДНК, які мають високий рівень реакційної здатності, мінімальні домішки повторюваних послідовностей, високий рівень мітки, а також оцінити кінетичну складність цієї фракції. Виходячи з цього УП ДНК сояшника, виділену як описано вище, мітили ^3H -ДЦТФ за допомогою системи для нік-трансляції по рекомендаціям фірми Amersham. При цьому суттєвим етапом підготовки ^3H -УП ДНК було вилучення обернених повторів, що складали для сояшника в середньому 18%, тому що їх наявність вмові значно вплинуло на оцінку кінетичної складності ДНК і РНК. Питома радіоактивність ^3H -мічених УП ДНК дорівнювала $1,8 \cdot 10^5$ імп/хв·мкг.

На рис.3 наведені результати кінетики реасоціації ^3H -мічених УП ДНК з надлишковою кількістю немічених фрагментів ДНК. Унікальні послідовності ДНК сояшника реасоціювали згідно кінетики реакції другого порядку, при цьому при початкових значеннях C_{0t} частка реасоційованих УП ДНК не перевищувала 5%, тобто препарат практично не містив домішок повторюваних послідовностей, тоді як при кінцевих значеннях C_{0t} біля 20% цих послідовностей не утворювали дуплекси, що враховувалось при оцінці складностей нуклеотидних послідовностей мРНК і яРНК, а саме, вводилась поправка на кількість молекул ДНК, здатних до гібридизації.

Раніше було визначено, що частка УП ДНК сояшника складає 20,6% геному [Лобов В. П., 1984]. Враховуючи, що розмір гаплоїдного геному сояшника дорівнює $4,66 \cdot 10^9$ пар нуклеотидів, оцінили, що кінетична складність унікальних послідовностей ДНК становить $0,96 \cdot 10^9$ пар нуклеотидів.

Таким чином, були отримані препарати ^3H -УП ДНК, які максимально очищені від домішок повторюваних послідовностей, мають високу питому активність мітки, зберігають високу реакційну здатність і можуть бути використані в реакціях з молекулярної гібридизації з метою оцінки складності полісомних і ядерних

РНК.

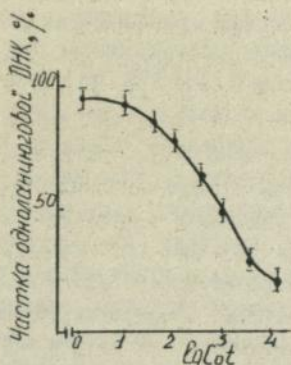


Рис. 3. Крива кінетики реасоціації ^3H -УП ДНК соняшника.

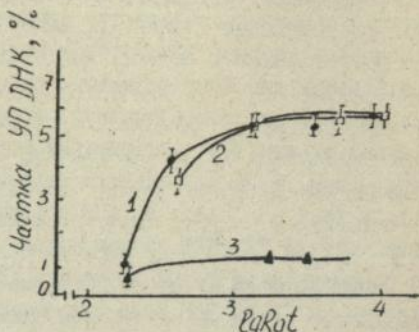


Рис. 4. Криві кінетики гібридизації ^3H -УП ДНК соняшника з полісомними РНК паростків(1), листків(2) та коренів(3).

3. Кінетична складність полісомних РНК паростків, листків та коренів соняшника. Гібридизація ^3H -мічених УП ДНК в надлишковою кількістю полісомних РНК різних органів дозволяє оцінити кількість різноманітних мРНК, що функціонують в цитоплазмі клітин. Як видно із рис. 4 криві гібридизації для паростків, листків та коренів досягають ділянки плато при різних значеннях Rot, а саме, для паростків та листків - приблизно $5 \cdot 10^3$, для коренів - $3 \cdot 10^3$. Тобто, при цих значеннях Rot молекули ДНК і РНК утворюють всі можливі дуплекси. Саме на підставі максимальних значень кількостей ^3H -УП ДНК, що гібридизуються із полісомними РНК, провели оцінку складності нуклеотидних послідовностей полісомних РНК досліджених органів. Розрахунки даних молекулярної гібридизації ДНК: РНК наведені в таб.1. Статистична обробка отриманих даних показала, що вірогідних відмінностей між кількістю ^3H -УП ДНК, що утворюють дуплекси із полісомними РНК паростків та листків, немає. При цьому, між кількостями ^3H -УП ДНК, що гібридизуються із полісомними РНК паростків та коренів, існує вірогідна різниця. Враховуючи поправки на асиметрію транскрипції та на кількість молекул ДНК, здатних до гібридизації, підра-

хували, що скоректоване значення частки УП ДНК, що гібриди-
ється в полісомними РНК, складало для паростків сояшника
14,68%, для листків - 14,70% та для коренів - 3,33%. На під-
ставі цих даних оцінили, що кінетична складність мРНК, яка
дорівнює добутку кінетичної складності УП ДНК та скоректова-
ного значення частки УП ДНК, що гібриди-ється в полісомними
РНК, дорівнює в паростках та листках сояшника приблизно по
 $1,41 \cdot 10^8$ нуклеотидів, а в коренях - $3,2 \cdot 10^7$ нуклеотидів.

Таблиця 1.

Складність нуклеотидних послідовностей мРНК вегетативних
органів сояшника ($M \pm m$, $n=4 \div 6$).

Параметри молекуляр- ної ДНК: РНК гібриди- зації	Орган		
	2-денний етиольова- ний парос- ток	перший справжній листок	корінь 5-денного етиольов. паростка
Частка УП ДНК, %, 1)*	5,87±0,21	5,88±0,21	1,33±0,01
Скоректоване значення частки УП ДНК, %, 2)*	14,68±0,53	14,70±0,53	3,33±0,03
Частка генома, %, 3)*	3,02±0,11	3,03±0,11	0,69±0,01
Складність полісомної РНК, нуклеотиди, 4)*	$1,41 \cdot 10^8 \pm$	$1,41 \cdot 10^8 \pm$	$3,20 \cdot 10^7 \pm$
Кількість генів, 5)*	94000±3400	94000±3000	21300±170

*Примітка. 1)-кількість ^{32}H -мічених УП ДНК, яка гібриди-ється в надлишковою кількістю полісомної РНК в області плато; 2)-частка УП ДНК 2/0,8; 3)-величина, що дорівнює добутку частки унікального компонента геному (20,6%) та частки УП ДНК, що гібриди-ється в полісомними РНК; 4)-добуток кінетичної складності УП ДНК ($0,96 \cdot 10^8$ пар нуклеотидів) та скоректованого значення частки УП ДНК; 5)- складність мРНК/1500, де 1500 - середній розмір мРНК в нуклеотидах.

Згідно літературних даних довжина різних молекул мРНК може значно відрізнятись, але середній розмір рослинних мРНК варіює в межах 1 300 - 1 500 нуклеотидів [Kamalay J., 1980]. Якщо припустити, що середній розмір мРНК дорівнює 1500 нуклеотидів, то кількість генів, що експресується в паростках, листках та коренях відповідно складає 94 000, 94 000 та 21 300 різноманітних транскриптів. При цьому, враховуючи, що унікальні послідовності ДНК у геномі сояшника становлять 20,6%, підрахували, що в полісомах вегетативних органів рослини $3,2 \cdot 10^7$ - $14,10 \cdot 10^7$ нуклеотидів різноманітних мРНК транскрибуються лише з 0,69 - 3,03% всього геному сояшника.

Внаслідок молекулярної гібридизації УП ДНК з полісомними РНК паростків 14,68% УП ДНК утворює дуплекси з матрицями, функціонуючими в цитоплазмі клітин паростків. Інші 85,32% УП ДНК, що не представлені в полісомах паростків, отримали назву нуль-мДНК паростків. Гібридизація цієї фракції УП ДНК з полісомними РНК коренів та листків дозволяє виявити набори матриць, функціонуючих лише в клітинах цих органів і відсутніх в цитоплазмі клітин паростків, визначити складність органоспецифічних РНК і оцінити тим самим диференційну активність генів в процесі морфогенезу сояшника. В зв'язку з цим, нами була відокремлена фракція нуль-мДНК паростків і проведена молекулярна гібридизація з полісомними РНК листків та коренів. Як видно із результатів, наведених в таб.2, частка ^{32}N -нуль-мДНК, що гібридизувалася із полісомними РНК листків та коренів, складала відповідно 0,37% та 0,34%, в той час як ^{32}N -нуль-мДНК із полісомними РНК паростків практично не гібридизувалася. Оскільки складність нуклеотидних послідовностей фракції ^{32}N -нуль-мДНК дорівнювала $8,19 \cdot 10^6$ нуклеотидів, оцінили, що складність нуклеотидних послідовностей органоспецифічних мРНК листків та коренів відповідно складає $7,58 \cdot 10^6$ нуклеотидів та $6,96 \cdot 10^6$ нуклеотидів, а це становить лише 0,072 та 0,066 % всього геному рослини. Тобто в 22-денних перших справжніх листках сояшника з'являється приблизно 5 000 нових функціонуючих мРНК відносно до всього спектру мРНК 2-денних паростків, а в коренях 5-денних паростків, хоча загальна складність мРНК в 4,4 рази менше, ніж складність мРНК паростків, з'являється біля 4 600 нових матриць, що не функціону-

ють в цитоплазмі клітин 2-денних паростків сояшника.

Таблиця 2.

Параметри молекулярної гібридизації ^{32}P -нуль-мДНК паростка в полісомними РНК листків та коренів сояшника (M_{11m} , $n=4\div 6$).

	Орган	
Параметри молекулярної ДНК: РНК гібридизації :	Перший справжній листок	Корінь 5-денного етиольованого паростка
Частка ^{32}P -нуль-мДНК, % :	$0,37 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,03$
Складність мРНК, нуклеотиди :	$7,58 \cdot 10^3 \pm 3,68 \cdot 10^3$	$6,96 \cdot 10^3 \pm 6,75 \cdot 10^3$
Кількість генів :	$5\ 000 \pm 245$	$4\ 600 \pm 450$
Частка геному, % :	$0,072 \pm 0,004$	$0,066 \pm 0,006$

Таким чином, в'ясовано, що на відміну від даних [Kamalay J. C. and Goldberg R. B., 1984] щодо полісомних РНК вегетативних органів тютюну, кінетична складність яких майже не відрізняється, в вегетативних органах сояшника реалізується інформація в рівній кількості різноманітних генів. Показана надлишковість всього геному в цілому і надлишковість унікальних послідовностей ДНК. При цьому, гібридизація нуль-мДНК паростків в полісомними мРНК листків та коренів дозволила виявити, що складність органоспецифічних мРНК цих органів відповідає лише 0,066%-0,072% всього геному.

4. Складність нуклеотидних послідовностей яРНК паростків та коренів сояшника. Процеси диференціації та морфогенезу в рослинних організмах характеризуються експресією специфічних наборів генів. Оцінити роль транскрипційного та посттранскрипційного рівнів регуляції у формуванні спектрів послідовностей мРНК, функціонуючих в окремих органах рослини, можна завдяки порівнянню наборів яРНК рівних органів та відповідних наборів мРНК.

Для оцінки складності послідовностей яРНК паростків і коренів на перших етапах було відпрацьовано метод виділення ядер в досліджуваних органів. Попередньо був застосований метод виділення ядер в ступінчатому градієнті сахарози [Hamilton R. H., 1972], однак ні варіації в солевому складі буферів, ані в процентному вмісті сахарози не принесли жаданого результату. Препарат, отримуваний цим шляхом, містив більшість зруйнованих ядер. Навпаки, використання дещо модифікованого методу, заснованого на концентруванні ядер у вузькій зоні між 50% і 80% гліцерином, дозволяв отримувати препарати з високим виходом незруйнованих ядер, що становив в середньому $5,1 \cdot 10^8 \pm 0,8 \cdot 10^8$ ядер на грам рослинної тканини. Абсолютна кількість яРНК, що виділяли за дещо модифікованим методом Маніатіса Т. [1984], в коренях та паростках коливалась в межах 0,01 - 0,03 пг РНК/ядро.

Таблиця 3.

Складність нуклеотидних послідовностей яРНК паростків та коренів соняшника (M±m, n=5÷7).

	Орган	
Параметри молекулярної ДНК: РНК гібридизації	2-денний етиольований паросток	Корінь 5-денного етиольованого паростка
Частка УП ДНК, %	20,92 ± 0,62	3,23 ± 0,22
Скоректоване значення частки УП ДНК, %	50,47 ± 1,50	7,88 ± 0,54
Частка генома, %	10,40 ± 0,16	1,62 ± 0,01
Складність яРНК, нуклеотиди	$4,85 \cdot 10^8 \pm 7,27 \cdot 10^8$	$7,57 \cdot 10^7 \pm 4,10 \cdot 10^8$

Наступним етапом досліджень стало визначення та порівняння кінетичної складності нуклеотидних послідовностей яРНК паростків та коренів соняшника, складність полісомних РНК яких

відривнялась в 4,4 рази. Таб. 3 містить основні показники молекулярної ДНК: яРНК гібридивації паростків та коренів соняшника. Зокрема, в ядрах паростків транскрибується в 6,41 рази більше яРНК ніж в ядрах коренів. При цьому порівняння ядерних і полісомних РНК паростків і коренів дозволило встановити, що складність полісомної РНК паростків в 1,86 рази більша за складність ядерної РНК коренів. Це є прямим свідомством того, що регуляція експресії геному соняшника на транскрипційному рівні зумовлює кількісні та якісні відмінності в наборах мРНК, що транскрибуються в цитоплазмі клітин паростків та коренів.

Що стосується повноти експресії генетичної інформації соняшника та диференціальної активності генів, то рис. 5 наочно демонструє співвідношення складностей всього геному соняшника, його унікального компонента та отриманих даних щодо складності ядерних та полісомних РНК паростків та коренів рослини.

Зокрема, складності яРНК паростків та коренів соняшника перевищують складність полісомних мРНК відповідно в 3,44 та 2,37 рази, складаючи при цьому десяту, або навіть меншу частку геному.

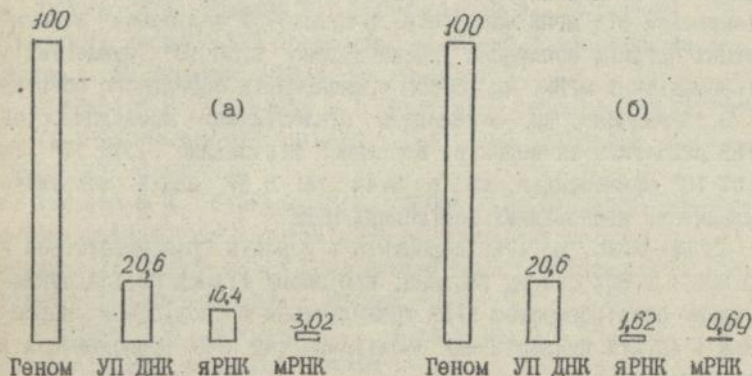


Рис. 5. Нуклеотидні послідовності 2-денних етиольованих паростків (а) та коренів 5-денних етиольованих паростків (б) соняшника.

Колонка відображає складність нуклеотидних послідовностей фракції нуклеїнових кислот, виражену в % геному.

Увагальнення. Таким чином, методом молекулярної гібридизації УП ДНК з надлишковою кількістю полісомних та ядерних РНК оцінено складності нуклеотидних послідовностей мРНК та яРНК вегетативних органів сояшника, а також органоспецифічних мРНК листків та коренів, які відбивають повноту експресії всього геному рослини і диференціальну активність генів в процесі морфогенезу сояшника. Порівняльний аналіз отриманих даних свідчить, що регуляція експресії генів сояшника на транскрипційному рівні зумовлює кількісні та якісні відмінності в наборах мРНК, що трансклюються в цитоплазмі клітин паростків та коренів.

ВИСНОВКИ

1. З'ясовано, що в полісомах дводенних етиольованих паростків, 20-22-денних перших справжніх листків та 5-денних коренів представлено відповідно $1,41 \cdot 10^{10}$; $1,41 \cdot 10^{10}$ та $3,20 \cdot 10^7$ нуклеотидів різноманітних молекул мРНК, які транскрибуються в 3,03%; 3,03% та 0,69% геному. Складність нуклеотидних послідовностей мРНК паростків та листків в 4,4 рази перевищує складність мРНК коренів.

2. Досліджено, що в коренях сояшника функціонує $6,69 \cdot 10^{10}$ нуклеотидів, а в листках - $7,58 \cdot 10^{10}$ нуклеотидів мРНК, що відрізняються від мРНК паростків. В цілому, в полісомах вегетативних органів сояшника представлено $1,58 \cdot 10^{10}$ нуклеотидів різноманітних мРНК, чи 100600 транскриптів середнього розміру.

3. Визначено, що складність нуклеотидних послідовностей яРНК паростків та коренів дорівнює відповідно $4,85 \cdot 10^{10}$ та $7,57 \cdot 10^7$ нуклеотидів, що в 3,44 та 2,37 разів перевищує складність відповідних полісомних мРНК.

4. Виявлено, що яРНК паростків і коренів транскрибуються в 10,40% і 1,62% геному рослини, при цьому тільки 29,13% нуклеотидних послідовностей яРНК трансклюються в полісомах паростків і 42,27% нуклеотидних послідовностей яРНК трансклюються в полісомах коренів.

5. Визначено, що в ядрах паростків сояшника кількість різноманітних яРНК в 6,4 рази перевищує кількість різноманітних яРНК в клітинах коренів. Окрім цього, складність яРНК коренів в 1,86 рази менше, ніж складність полісомних РНК паростків.

6. Вперше виявлена кількісна варіабельність складності нуклеотидних послідовностей полісомних та ядерних РНК вегетативних органів. Порівняння складностей полісомних та ядерних РНК свідчить про наявність регуляції експресії геному соняшника в процесі морфогенеза на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях.

Рекомендації. Отримані дані можуть бути покладені в основу подальших досліджень особливостей регуляції експресії генів в онтогенезі соняшника, бути використані при створенні сучасної теорії індивідуального розвитку рослин, в навчальному процесі.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ

1. Лобов В. П., Тищенко Е. Н., Кунцевич В. И. Сложность нуклеотидных последовательностей полисомной РНК вегетативных органов подсолнечника // Физиология растений. -1991. -38, вып. 6. - С. 1110-1116.
2. Лобов В. П., Тищенко Е. Н., Кунцевич В. И. Количество и разнообразие транслируемых мРНК проростков и листьев подсолнечника // Доповіді. АН України. -1992. -5. -С. 135-137.
3. Кунцевич В. И., Тищенко Е. Н., Лобов В. П., Хилько Т. Д. Сравнительное исследование ядерной РНК и полисомной мРНК проростков подсолнечника // Укр. биохим. журн. -1994. -Т. 66. - №5. -С. 96-100.
4. Тищенко Е. Н., Сакало В. Д., Кунцевич В. И., Билинская А. Т. Сложность ядерной РНК проростков и корней подсолнечника // Доповіді АН України. -1994. -№8. -С. 162-165.
5. Тищенко О. М., Кунцевич В. І. Нуль-мДНК паростків соняшника // VI Український біохімічний з'їзд. Тези доповідей. -Київ. -1992. -Ч. 2. -С. 53.
6. Тищенко Е. Н., Кунцевич В. И., Лобов В. П. Сложность нуклеотидных последовательностей мРНК вегетативных органов подсолнечника // Второй съезд Всесоюзного общества физиологов растений. Тезисы докладов. - Москва. -1992. -Ч. 2. -С. 209.
7. Тищенко О. М., Кунцевич В. І., Москаленко О. В., Лобов В. П. Варіабельність складності нуклеотидних послідовностей полісомної РНК коренів та паростків соняшника // II з'їзд Українського товариства фізіологів рослин. Тези доповідей. -Київ. -1993. -Т. 2. -С. 94-95.
8. Tishchenko E. N., Kuntsevitch V. I., Bilinskaya A. T. Nuc-

lear RNAs in sunflower // 9th Congress of the FESPP.-Brno. -1994. -P. 11.

9. Tishchenko E. N., Kuntsevitch V. I., Bilinscaya A. T. Post-transcriptionally regulation of some structural genes of sunflower // Congresul I, Prolemele fiziologiei si biochimiei plantelor.- Shisinau. -1994. -P. 86.

АННОТАЦІЯ

Кунцевич В. І., "Сложность нуклеотидных последовательностей мРНК вегетативных органов подсолнечника".

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - "биохимия". Киевский университет им. Тараса Шевченко, Киев, 1994.

Защищается 9 научных работ, в которых содержатся результаты молекулярной гибридизации УП ДНК с избытком полисомных и ядерных РНК вегетативных органов подсолнечника. Впервые выявлена количественная вариабильность кинетической сложности нуклеотидных последовательностей полисомных и ядерных РНК вегетативных органов, которая отражает дифференциальную активность генов в процессе морфогенеза подсолнечника.

BRIEF INFORMATION

Kuntsevitch V. I. " Sequence complexities of polysomal RNAs from sunflower vegetative organs".

Thesis for obtaining a scientific grade of the Candidate of biological sciences on a speciality 03.00.04-biochemistry, Kiev University named after Taras Shevchenko, Kiev, 1994. The 9 scientific articals are defended. They contain the results of sensitive polysomal and nuclear RNA-excess/single-copy DNA hybridization reactions. For the first time we have discovered quantitive variability of polysomal and nuclear RNA sequence coplexities of vegetative organs, which reflect differential gene activity during sunflower morphogenesis.

Ключові слова. Helianthus annuus L. - експресія генома - нуклеотидні послідовності - полісомна РНК - органоспецифічні мРНК - яРНК.

Підписано до друку .12.94.
Формат 60 x 84 1/16. Папір друк.
Офсетний друк. Ум. друк. арк. 0,93.
Тираж 100 прим. Зам. 1495 к.

ДВПІ ДКНТ, 252171 Київ - 171,
вул. Горького, 180.

455557

AB 31.666