

ISSN 2221-9927

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
«НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК БЕЛАРУСИ ПО БИОРЕСУРСАМ»

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОТАНИКИ ИМЕНИ В.Ф.КУПРЕВИЧА НАН БЕЛАРУСИ»
ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ «БЕЛОРУССКОЕ БОТАНИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»
БЕЛОРУССКОЕ ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ ФИЗИОЛОГОВ РАСТЕНИЙ

БОТАНИКА

(ИССЛЕДОВАНИЯ)

Выпуск 41

Минск
«Право и экономика»
2012

Ботаника (исследования): Сборник научных трудов. Выпуск 41 /
Ин-т эксперимент. бот. НАН Беларуси – Минск: Право и экономика,
2012. - 458 с.

ISSN 2221 - 9927

В сборнике представлены оригинальные научные статьи белорусских ученых из ведущих научно-исследовательских учреждений Национальной академии наук и ВУЗов Беларуси, содержащие результаты экспериментальных исследований, теоретических и практических разработок в широком спектре направлений ботанической науки, физиологии и экологии растений.

Публикуемые в сборнике научные статьи рецензируются ведущими специалистами в области ботаники, экологии, физиологии и биохимии растений.

Р е д а к ц и о н н а я к о л л е г и я :

акад. НАН Беларуси, проф. Н.А.Ламан
акад. НАН Беларуси, проф. В.И.Парфенов
к.б.н. Д.Г.Груммо
к.б.н. Н.А.Копылова
д.б.н. В.Н.Прохоров
к.б.н. А.В.Пугачевский
д.б.н., проф. Л.М.Сапегин
член-корр. НАН Беларуси, проф. Е.А.Сидорович
д.б.н. В.В.Сарнацкий
д.б.н. Г.Ф.Рыковский
д.б.н., проф. А.Т.Федорук
к.б.н. Е.О.Юрченко

Н а у ч н ы е р е д а к т о р ы :

акад. НАН Беларуси, проф. Н.А.Ламан
акад. НАН Беларуси, проф. В.И.Парфенов

О т в е т с т в е н н ы й с е к р е т а р ь

к.б.н. Т.А.Будкевич

ISSN 2221 - 9927

© ГНУ «Институт экспериментальной
ботаники имени В.Ф.Купревича», 2012
© Оформление. ИООО «Право и экономика», 2012

Экология и физиология растений

УДК 577.113:581.142.085.2

О. П. БУЛКО

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ И ЯДРАМИ НА ПРИМЕРЕ ПРОРОСТКОВ РЖИ (*SECALE CEREALE* L.) В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Центральный ботанический сад НАН Беларуси

Введение. В специальной литературе описаны многочисленные подходы и модификации при выделении нуклеиновых кислот из бактерий, тканей животных и растений [1-6]. Критерием качества выделяемых препаратов являлись их чистота, высокий выход и целостность макромолекул. При этом использовались традиционные приемы: разрушение тканей и клеток, подавление действия нуклеаз и очистка нуклеиновых кислот от многочисленных примесей. Несмотря на это, в настоящее время периодически публикуются протоколы методик выделения нуклеиновых кислот, которые, несмотря на их совершенство и многочисленные апробации, содержат значительное количество этапов при очистке с затратой времени [7-10]. При препаративной экстракции такое количество этапов может достигать до 15-ти и более. В результате не исключены гидродинамические воздействия и, как следствие, фрагментация нуклеиновых кислот при встряхивании растворов, переосаждении и обработке различными реактивами в процессе депротеинизации.

Цель работы – использовать неочищенные препараты нуклеиновых кислот для внедрения их в клетки, разделенные кислотной мацерацией с последующей экстракцией из этих тканевых структур. Планировалось экспериментально продемонстрировать возможность взаимодействия очищенных ДНК с модифицированными ядрами, полученными из проростков ржи.

Материалы (объекты) и методы исследования. Источником для выделения нуклеиновых кислот служили проростки ржи. Семена стерилизовали и проращивали в дистиллированной воде в

чашках Петри на фильтровальной бумаге в темноте. После 48 ч прорастания этиолированные осевые части проростков отделяли от эндоспермов и растирали в фарфоровой ступке в растворе, содержащем 0,15 М NaCl, 0,01 М EDTA, 0,015 М цитрата натрия, 1% ДДС, трис pH 8,2. Затем гомогенат переносили в центрифужные пробирки и прогревали при 60°C в течение 10 мин. Проинкубированный раствор охлаждали до 2°C и пробирки центрифугировали при 5 000x g для отделения твердых компонентов тканей. Комплекс ДДС-НК-белок осаждали, внося в охлажденный этанол. Осадок НК-белок растворяли в буфере 1 SSC (0,15 М NaCl – 0,015 М цитрата натрия, pH 7,0). В результате был получен опалесцирующий раствор для дальнейших исследований. При использовании этого методического подхода процедура выделения комплекса НК-белок была сведена к минимуму.

Другая процедура включала после прогрева при 60°C депротеинизацию гомогената осевых частей проростков в растворе, описанном выше, последовательно водонасыщенным фенолом-м-крезолом pH 6,0, хлороформом-изоамиловым спиртом (24:1). Освобождение от РНК осуществлялось преинкубированной при 80°C рибонуклеазой для устранения ДНК-азной активности.

Разделение осевых частей проростков на клетки (мацерация) заключалось в фиксировании растительного материала 30% водным раствором этанола, содержащим 4% глутарового альдегида с последующим замещением этих веществ соединением глицерин-соляная кислота (1 часть 12 н HCl и 1 часть глицерина). Непосредственное разделение тканей на клетки проходило при их прогревании в пробирках на водяной бане при 100°C в течение 30-40 сек. После отмывания клеток 30% глицерином до нейтральной реакции, клетки сохраняли свою структуру в этом растворе в течение нескольких месяцев.

Клеточные ядра выделены гомогенизацией проростков в трис-HCl буфере pH 7,2, содержащем 0,4 М сахарозу, 25% глицерин, 0,02 М MgCl₂, 0,03М CaCl₂ в градиенте 2,0; 1,5; 1,0 М сахарозы в присутствии детергента Тритон-Х 100. Суспензию ядер модифицировали по методике, описанной выше для мацерации клеток.

Результаты и их обсуждение. Микроскопические наблюдения клеток после их разделения (мацерации) показали их 100%-ю внешнюю сохранность, несмотря на применение жестких

обработок (этанол, соляная кислота, высокая температура) (рис. 1). На рисунке можно видеть ядра, лежащие на внутренней стенке клеток, и другие клеточные структуры. При мацерации тканей в этих условиях происходил гидролиз нуклеиновых кислот. Следует отметить, что мацерирующая смесь при спектрофотометрии поглощает в области 220-290 нм. Поглощение в области 270-280 нм свидетельствует о присутствии нуклеопротеидных комплексов, а в области 220-230 нм предположительно поглощают полипептиды. Клетки в суспензии не окрашивались специфическими красителями на нуклеиновые кислоты, окрашивание в желтый цвет наблюдалось при использовании реактива, содержащего хлористый цинк, йодистый калий и йод. Цитохимически обнаружена целлюлозная составляющая клеток с сохранением клеточного каркаса при отсутствии нуклеиновых кислот.

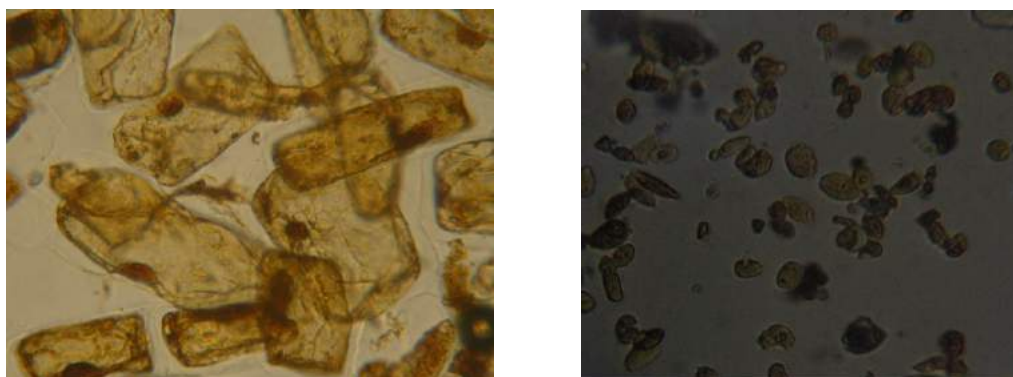


Рис. 1. Клетки проростков, полученные при мацерации растительных тканей (слева) и ядра тканей, очищенные в градиенте плотности сахарозы и обработанные мацерирующей смесью (справа).

При обработке клеточных ядер мацерирующей смесью их внешняя морфологическая структура сохраняется в суспензии без заметных повреждений. После отделения ядер центрифугированием спектры мацерирующей смеси, показали наличие компонентов, поглощающих в области 220–290 нм. В ядерных структурах, как и в клетках, не обнаружено нуклеиновых кислот при окрашивании специфическими красителями. Таким образом, в клетках и ядрах имеется свободное пространство, не заполненное нуклеопротеидами.

Система *in vitro* для внедрения в так называемое “свободное пространство”, состояла из суспензии клеток, отмытых от глицерина в буферном растворе 1 ССР (0,1 М NaCl, 0,01 М

натрий лимоннокислый), суспензированных в этом же растворе и нуклеопротеидного комплекса (опалесцирующего раствора). Реакционная смесь состояла из 2,0 мл клеток, полученных из 25 проростков и 2,0 мл нуклеопротеидного комплекса. Эти два раствора объединяли в центрифужной пробирке для контакта суспензированных клеток с непрозрачным опалесцирующим раствором. Клетки отделяли центрифугированием и надосадочную жидкость сливали. После промывки клеток раствором 1 ССР клетки суспензировали в растворе 10 ССР (1,0 М NaCl, 0,1 М натрий лимоннокислый). После центрифугирования надосадочную жидкость сливали. Растворы подвергали спектрофотометрическому анализу, их спектры представлены на рисунке 2 а .

В последующем эксперименте суспензию ядер проростков смешивали с очищенной ДНК в объеме 4,0 мл с использованием методического приема, описанного для клеток. Спектрофотометрический анализ представлен на рисунке 2 б.

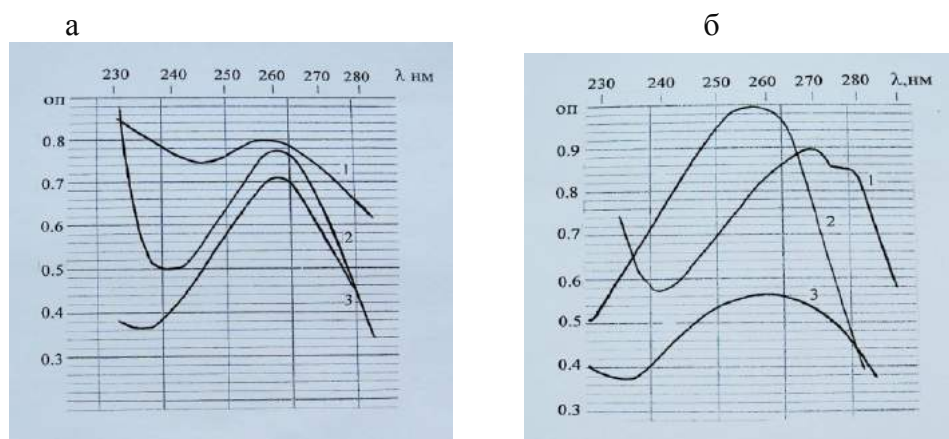


Рис. 2. Спектрофотометрический анализ тотального препарата НК при взаимодействии с клетками (а) и очищенного препарата ДНК при взаимодействии с ядрами (б).

Тотальный препарат нуклеиновых кислот (нуклеопротеидный комплекс) при спектрофотометрическом анализе показал типичную спектральную характеристику неочищенного соединения (опалесцирующий раствор) (рис.2а,1). При контакте опалесцирующего раствора с разделенными клетками происходит его осветление со значительно улучшенными спектральными характеристиками. После осаждения клеток центрифугированием соотношение экстинций 260:280 нм в надосадочной жидкости составило 2,22 (рис.2а,2). Последующее суспензирование клеток в

растворе 1 ССР и их осаждение центрифугированием для получения надосадочной жидкости позволило получить НК с соотношением экстинций 260:280 нм равным 2,05 (рис.2а,3).

Взаимодействие нуклеопротеидных комплексов с клетками при данном методическом подходе не является поверхностным. Окрашивание клеток метиленовым зеленым – пиронином при микроскопическом исследовании показало их проникновение в освобожденное пространство клеток после действия мацерирующей смеси.

Раствор мацерирующей смеси после взаимодействия с ядрами показал характерный спектр нуклеопротеидного комплекса с максимумами поглощения в области длин волн 270 и 280 нм (рис.2б,1). При использовании ДНК в 1,0 оптическую единицу плотности (рис.2б,1) ядра, предварительно освобожденные от нуклеопротеидных комплексов, поглотили определенное количество ДНК. Спектр 3, (рис. 2б) в надосадочной жидкости характерен для неочищенного препарата ДНК. После последовательного насыщения этих неочищенных растворов ДНК ядрами, соотношения длин волн 260:280 в надосадочной жидкости доходило до 1,40 и менее. Следовательно, ядра не поглощали в надосадке соединения с большим количеством примесей. Другой феномен заключался в том, что ядра не воспринимали дрожжевую коммерческую ДНК и ДНК, выделенную из листьев других растений, что требует объяснения. Неясным является также механизм проникновения высокомолекулярных соединений через поры модифицированных клеток и ядер.

Было рассчитано количество ДНК, внедренных в ядра. Измерения при 260 нм в очищенных препаратах ДНК дают возможность рассчитать количество НК в пробе, где 1,0 оптическая единица плотности соответствует 50 мкг/мл НК. Суспензия состояла из 2 000 000 ядер и ДНК с концентрацией в 1,0 оптическую единицу плотности. Содержание в ядрах измерялось по убыли ДНК в надосадочной жидкости. По результатам расчета, одно усредненное ядро содержало 18 – 20 пг ДНК, что, по данным из других источников [6], соответствует количеству ДНК в ядре.

Заключение. Цель исследования состояла в доказательстве на примере проростков ржи возможности получения модифицированных клеток и ядер и внедрения в них высокомолекулярных соединений. При мацерации тканей на клетки

происходит экстракция нуклеопротеидных комплексов с сохранением клеточных каркасов. Отсутствие нуклеиновых кислот и наличие в составе клеток углеводных компонентов подтверждается цветными реакциями на эти соединения. После действия данной смеси на суспензию ядер также сохраняется их внешняя целостность. Во избежание гидродинамического удара и сохранения молекулярной целостности НК традиционными методами была исключена очистка их от белковых составляющих. При контакте нуклеопротеидных комплексов с суспензиями модифицированных клеток происходит их поглощение с осветлением опалесцирующих растворов. Характеристика спектров после экстракции нуклеиновых кислот из клеток и ядер позволяет судить об их высокой чистоте. Использование модифицированных клеток, сохраняющихся в суспензии длительное время, и нуклеиновых кислот, не подвергнутых разрушающему воздействию в процессе выделения, может иметь практическое приложение.

Литература

1. Kirbi K.S. // *Biochem.J.* 1957. Vol. 66. P. 495–504.
2. Marmur J. // *J. Mol. Boil.* 1961. P. 208–212.
3. Jons A.S. // *Nature (London)*. 1963. Vol. 199. P. 280–282.
4. Конарев В.Г., Тютерев С.Л. Методы биохимии и цитохимии нуклеиновых кислот. Л., “Колос”. 1970. С. 53–75.
5. Katterman F.R.H. // *Anal. Biochem.* 1975. P. 156 -160.
6. Сиволап Ю.М. // Методы выделения и анализ высокополимерных соединений из тканей сельскохозяйственных растений : Сборник научных трудов. Одесса. 1983. С. 5–23.
7. Патрушев В.А. Искусственные генетические системы. Т.1. Генная и белковая инженерия. М. : Наука. 2004. С. 40–43.
8. Митман Ф., Дистбах С., Вагнер Г. // *Физиол. раст.* 2007. Т. 54. С. 634 – 638.
9. Су М., Цзан В., Яо Н. Хуан М. // *Физиол. раст.* 2009. Т. 56. С. 791 – 795.
10. http://www.Molbiol.ru/protocol/14_05.html.

О.П. БУЛКО
**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПРИ ИЗУЧЕНИИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ
С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ И ЯДРАМИ НА
ПРИМЕРЕ ПРОРОСТКОВ РЖИ (*SECALE CEREALE L.*) В СИСТЕМЕ
*IN VITRO***

Резюме

Описан метод разделения растительной ткани на клетки и изоляции ядер. Из клеток и ядер были экстрагированы компоненты нуклеиновых кислот. Свободное пространство заполнялось неочищенными нуклеиновыми кислотами, которые очищались после их экстракции из клеток и ядер. Представлен простой метод очистки нуклеиновых кислот без их разрушения.

O. P. BULKO
**METHODICAL APPROACH FOR STUDY OF INTERACTION
OF NUCLEIC ACIDS WITH MODIFIED CELLS AND NUCLEI ON
SEEDLINGS OF RYE (*SECALE CEREALE L.*) *IN VITRO* SISTEM**

Summary

The division method of plant tissue into cells and nuclei isolation were described. Nucleic acids components have been extracted from these cells and nuclei. Free space was filled with the contaminating nucleic acids. They have been purified after extraction out of cells and nuclei. Simple method of nucleic acid purification with any distraction is given.

Поступила в редакцию 29.11.2011 г.