



УДК 577.11

## Использование фенол-хлороформной экстракции и ионообменной хроматографии для изучения экспрессии генов *СУТ-MDH* и *MT-MDH* в щитках кукурузы

Попов В.Н.<sup>1</sup>, Мальцева Е.В.<sup>1</sup>, Грабельных О.И.<sup>2</sup>,  
Стробыкина А.С.<sup>3</sup>, Горшенёва Е.Б.<sup>4</sup>, Лебедева О.П.<sup>5</sup>, Фоменко О.Ю.<sup>6</sup>,  
Семенова Е.В.<sup>7</sup>, Чекменева Ю.В.<sup>8</sup>, Карпеченко Н.А.<sup>9</sup>, Божко О. Ю.<sup>10</sup>

*1 – Воронежский государственный университет, Воронеж; 2 – Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск; 3 – Казанский (Поволжский) федеральный университет, Казань; 4 – Тамбовский государственный университет, Тамбов; 5 – Белгородский государственный университет, Белгород; 6 – Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии, Воронеж; 7 – Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж; 8 – Воронежская государственная лесотехническая академия, Воронеж; 9 – Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции, Воронеж; 10 – Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж*

Поступила в редакцию 05.07.2011 г.

### Аннотация

Нами показано, что для выделения мРНК возможно использование фенол-хлороформной экстракции в комбинации с ионным обменом на анионите АВ-17. В данной работе сделана попытка проанализировать в процессе онтогенеза растений происходит регуляция метаболических путей на молекулярном уровне. Дифференциальная экспрессия гена МДГ проявляется в наличии нескольких форм фермента, что может являться одним из механизмов регуляции метаболических путей в растительной клетке.

**Ключевые слова:** фенол-хлороформная экстракция, малатдегидрогеназа, экспрессия

Us is rotined, that for mRNA isolation Phenol - Chloroform extraction in combination with an ion exchange on an anionite AV - 17 is possible. In the given activity the attempt is made to analyze during an ontogenesis of plants there is a regulation of metabolic pathways on molecular level. The differential expression of a malate dehydrogenase gene shows available of several forms of an enzyme, that can be one of gears of a regulation of metabolic pathes in a vegetative cell.

**Keywords:** Phenol-chloroform extraction, malate dehydrogenase, expression

### Введение

Фотосинтез – фундаментальный процесс, обеспечивающий фотоавтотрофность растительного организма. Он является начальным этапом сложных реакций метаболических процессов, обеспечивающих в конечном итоге

рост и развитие растения. Дыхание растений представляет собой комплекс трёх взаимосвязанных процессов – гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и ЭТЦ. Восстановительные эквиваленты, которые образуются в результате функционирования цикла трикарбоновых кислот, используются ЭТЦ. Её функционирование связано с транспортом электронов от НАДН, сукцината и компонентов ЦТК на кислород, в результате чего образуется протонный трансмембранный потенциал, направленный на синтез АТФ.

Для активного роста растительный организм должен часть синтезированных в ходе фотосинтеза субстратов окислять в процессе дыхания для получения интермедиатов и энергии с целью поддержания биосинтеза и связанных с ним процессов, в частности транспорта субстратов. Дыхание также необходимо для поддержания биомассы в активном состоянии. Процессы фотосинтеза и дыхания имеют следующие отличия 1) разные углеродные источники - на свету новые ассимилянты, в темноте - резервные; 2) биохимические модификации отдельных этапов темнового дыхания на свету; 3) разная реакция на неблагоприятные условия. Необходимо также учитывать степень заполненности метаболических и резервных пулов, что зависит от продолжительности светового периода и внешних условий [1]. Кроме того, известно, что в определенных условиях фотосинтез может снабжать АТФ, НАДФ и углеродными скелетами процессы, которые в норме поставляет дыхание, и таким образом, уменьшать долю дыхания и улучшать энергетический баланс в целом.

Для характеристики энергетического баланса целого растения часто используют соотношение суммарного темнового дыхания и фотосинтеза. Показано, что величина этого соотношения колеблется в пределах 0,3-0,6 [2], 0,35-0,45 [3]. По мнению М.Канела и Дж.Горнли это соотношение консервативно, но вариабельно [3]. В неблагоприятных условиях среды доля дыхательных затрат от фотосинтеза, как правило, увеличивается [2], реже наблюдается снижение.

За последние 50 лет представления о функциональной значимости темнового дыхания на свету неоднократно менялись, от полного отрицания существования окислительных процессов в фотосинтезирующих тканях до значительного усиления их на свету. В 50-е годы общепринятой была точка зрения, что темновое дыхание на свету и в темноте одинаково. В 70-80-е годы господствовали взгляды, согласно которым, темновое дыхание ингибируется светом и все функции по энергетическому обеспечению берет на себя фотосинтез. В тоже время появились работы, показывающие наличие темнового дыхания на свету, но с некоторыми модификациями [4]. В 90-е годы большая работа была проведена Мамушиной и др. [5], которые показали, что процессы фотосинтеза и дыхания взаимно дополняют друг друга в общем метаболизме клетки.

Малатдегидрогеназа является ферментом выполняющим в клетке ряд важных функции [6] Во-первых, данная ферментативная реакция является одним из этапов цикла трикарбоновых кислот, процесса, обеспечивающего нормальное функционирование клеточного дыхания. Образующийся при окислении малата НАДН используется далее митохондриальной электронтранспортной цепью. Кроме того, малатдегидрогеназа обеспечивает взаимосвязь органоидов клетки. Транспорт малата и оксалоацетата, в частности, обеспечивает перенос восстановительных эквивалентов между хлоропластами, цитозолем, микротельцами и митохондриями. Возможность образования устойчивых белковых комплексов МДГ с аспаратаминотрансферазой может обеспечивать отток  $C_4$  углеродных скелетов на биосинтетические процессы, в том числе синтез аминокислот [7].

Малатдегидрогеназа также может участвовать в глюконеогенезе при мобилизации запасных жиров, являясь ферментом глиоксилатного цикла [8].

В данной работе сделана попытка проанализировать возможность использования для выделения мРНК фенол-хлороформной экстракции и анионита АВ-17 и изучить с помощью ПЦР в реальном времени уровня относительной экспрессии гена *mt-mdh* в щитках *Z. mays* L. в процессе онтогенеза.

## Эксперимент

Суммарную РНК выделяли с использованием гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформного метода экстракции [9]. Эксплант гомогенизировали в буфере D (4 М гуанидинтиоцианат, 30 мМ цитрат натрия, 30 мМ β-меркаптоэтанол, рН 7,0), затем центрифугировали при 13000g 5 мин, отбирали супернатант и добавляли к нему 1 объем водонасыщенного фенола и 1/5 объема смеси хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1. Суспензию инкубировали на льду в течение 5 мин, перемешивая каждую минуту. Центрифугировали при 12000g (4°C) в течение 30 мин и отбирали водную фазу.

Выделение РНК из исследуемого биологического материала проводили с помощью сорбции. В качестве сорбента использовали сорбент АВ-17. К полученной суспензии добавили 40мкг сорбента, тщательно перемешали (перед добавлением водный раствор сорбента встряхнули до получения гомогенного состояния). Пробу инкубировали при комнатной температуре, в течение 10 мин. при перемешивании на шейкере. Также в течение инкубации, необходимо 1-2 раза встряхнуть пробирки на смесителе, чтобы предотвратить выпадение сорбента на дно пробирки. Затем пробу центрифугировали 15 сек. на микроцентрифуге при 13000 об/мин., надосадочную жидкость отбросили. Затем анионит промывали 300 - 400 мкл дистиллированной воды и элюировали 500 мкл 0,5 н NaOH.

В качестве осаждающего агента использовали равный объем 12 М раствора LiCl. Полученную смесь инкубировали 30 мин при -20°C, затем центрифугировали 15 мин при 13000g. Осадок промывали 80% этанолом, высушивали и растворяли в 40 мкл DEPC-воды. Осадок подсушивали в течение 10-15 мин. при +56 °С с открытой крышкой. К осадку добавляли 30 мкл деионизованной воды, перемешивали и инкубировали 15 минут при +56 С в закрытых пробирках. После чего центрифугировали в течение 1 мин. при 13000 об/мин. Отобранную надосадочную жидкость в дальнейшем использовали для ПЦР. Качество выделенной суммарной клеточной РНК контролировалось с помощью электрофоретического разделения в 1,0% агарозном геле.

Для визуализации и анализа качества выделенной РНК, а также продуктов полимеразной цепной реакции использовался электрофорез в 1% геле агарозы фирмы Helicon (Россия). Электрофорез проводился в электрофоретической камере типа “минисубмарина” в буфере 1x TAE (рН 8,5) при напряжении 7 В/см в течение 50 минут. Для флуоресцентного окрашивания нуклеиновых кислот использовали 0,1% раствор бромистого этидия. Визуализация результатов проводилась с использованием трансиллюминатора при длине волны 312 нм. Результаты фиксировались цифровой видеокамерой Samsung и обрабатывались с помощью пакета программ Gel Explorer 1.0.

Обратная транскрипция проводилась с использованием набора реактивов «Синтез первой цепи кДНК» фирмы «Силекс» согласно рекомендациям производителя. Для проведения реакции использовали 1 мкг тотальной РНК. В

качестве затравочного праймера использовался олиго-dT праймер. Обратная транскрипция проводилась в термоциклере «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) в течение 60 мин при температуре 37°C. Реакцию останавливали, инкубируя смесь 10 мин при 70°C.

Для идентификации исследуемых генов и проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени были специально разработаны наборы генспецифических праймеров. Разработка проводилась с использованием программного обеспечения Fast PCR (Финляндия) и Primer3 [10]. В качестве нормализатора использовали ген фактора элонгации трансляции *ef-1a*. Последовательности праймеров: F 5'-acaagattggtggtattggaac-3', R 5'-ggtgatctcaacagactts-3' ( $T_m=60^\circ\text{C}$ ).

Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием набора реактивов «Амплификация ДНК» фирмы «Силекс» и генспецифических праймеров. Реакция проводилась в термоциклерах Biometra® Personal Cycler, «Тецик» (ДНК-Технология, Россия) и Chromo 4 (Biorad, США) по следующей схеме: предварительная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 30 циклов: денатурация при 95°C в течении 30 секунд; отжиг праймеров при соответствующей  $T_m$  в течении 30 секунд; элонгация цепи при 72°C в течении 30 секунд; инкубирование смеси при 72°C в течении 5 мин.

Определение концентрации нуклеиновых кислот проводилось спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-46 («ЛОМО», Россия) при длине волны 260 нм. Степень чистоты препаратов нуклеиновых кислот определялась по отношению величин оптической плотности при 260 нм и 280 нм. Для чистых препаратов ДНК это отношение должно составлять 1.8-1.9, для РНК – 1.9-2.0.

## Обсуждение результатов

Для изучения экспрессионной регуляции функционирования малатдегидрогеназы была выделена суммарная РНК из щитков *Zea mays* L. В результате удалось получить высокоочищенные препараты суммарной клеточной РНК, в которых содержалось 28S рРНК и 18S рРНК (рис.1).

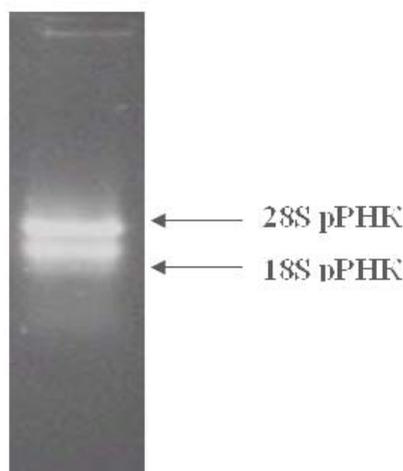


Рис. 1. Суммарная клеточная РНК, выделенная из щитков *Zea mays* L. в 1% агарозном геле.

Выделенную РНК использовали для проведения обратной транскрипции с целью получения кДНК. Полученную кДНК применяли для анализа экспрессии генов *cut-mdh* и *mt-mdh* с помощью полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. Результаты, полученные с помощью ПЦР в реальном времени для митохондриального гена малатдегидрогеназы показывают корреляцию экспрессии изучаемых генов *mt-mdh* и *cut-mdh* с ферментативной активностью малатдегидрогеназы. Так, на четвёртый день развития количество транскрипта значительно выше, чем в остальные дни. В последующие дни прорастания семян данный показатель постепенно снижается (рис. 2, 3).

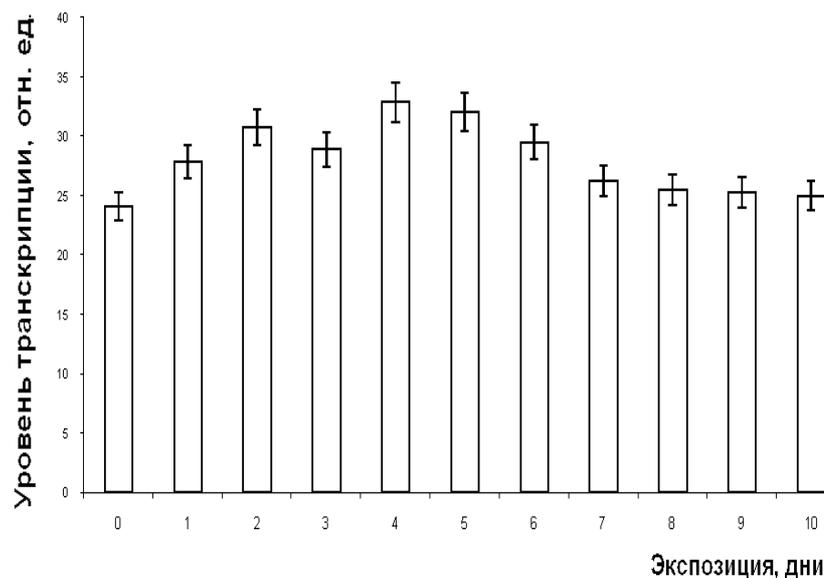


Рис. 2. Изменение уровня относительной экспрессии гена *mt-mdh* в щитках *Z. mays* L. в процессе онтогенеза

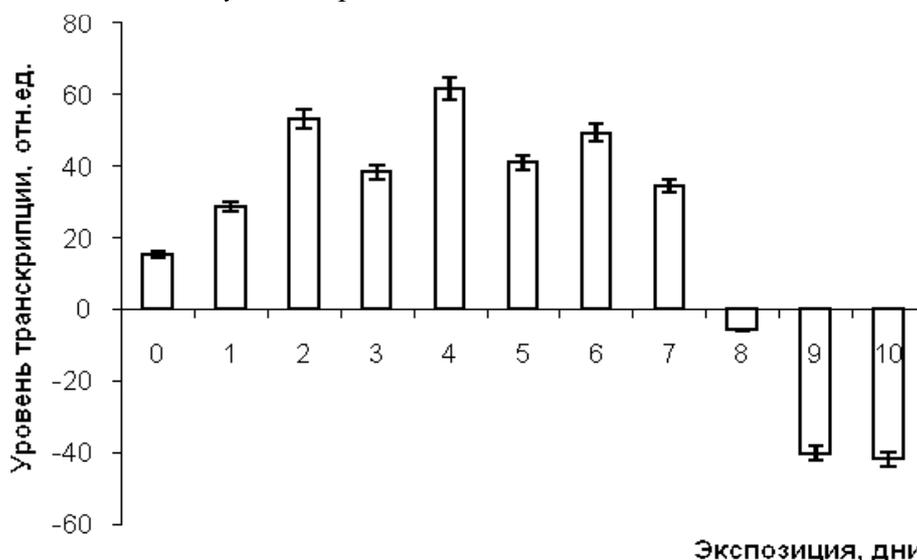


Рис. 3. Изменение уровня относительной экспрессии гена *cut-mdh* в щитках *Z. mays* L. в процессе онтогенеза

Возможно, это связано с тем, что синтезу белка и увеличению его активности должно предшествовать увеличение экспрессии гена. Изменение уровня мРНК генов

*mt-mdh* и *cyt-mdh*, отвечающих за синтез соответствующих форм фермента, приводит к изменению его ферментативной активности. При этом выявляется сходная картина в изменении экспрессии гена и каталитической активности фермента.

Данные, полученные в результате проведенных исследований позволяют сделать вывод об изменении работы ЦТК и предположить, какую роль играет данный метаболический путь при переходе к автотрофному типу питания в онтогенезе. В первые дни прорастания не обнаруживается фотосинтетической активности и зародышу необходимо получать дополнительную энергию в процессе дыхания. В результате происходит резкая активизация всех метаболических процессов и мобилизация запасных веществ, окисляющихся через ЦТК. Это подтверждается наличием активно транскрибируемых генов *mt-mdh* и *cyt-mdh* НАД<sup>+</sup> - зависимой оксидоредуктазной малатдегидрогеназы, свидетельствующих о высокой скорости функционирования цикла Кребса и малат-аспартатного челночного механизма. Однако по мере зеленения проростков функцию обеспечения растения энергией берет на себя фотосинтез и вклад ЦТК значительно снижается по сравнению с первыми днями.

Снижение интенсивности экспрессии генов *mt-mdh* и *cyt-mdh* после пятого дня прорастания свидетельствует о переключении энергетического метаболизма растительной клетки при переходе к фотосинтетической деятельности. На данном этапе развития снижается потребность в метаболизации запасных жиров, выключается глюконеогенез, что приводит к ингибированию экспрессии данных генов. Снижение интенсивности транскрипции генов *mt-mdh* и *cyt-mdh*, вероятно, можно объяснить тем, что роль ЦТК и малат-аспартатного челнока как поставщиков энергии и субстратов резко уменьшается при зеленении проростков и эту функцию начинает выполнять фотосинтетический аппарат клетки. При этом, небольшой уровень активности генов *mt-mdh* и *cyt-mdh* сохраняется, свидетельствуя о функционировании данных процессов в зеленых проростках для обеспечения протекания биосинтетических реакций и поддержания энергетического статуса клеток.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что для выделения мРНК возможно использование фенол-хлороформной экстракции в комбинации с ионным обменом на анионите АВ-17. В данной работе сделана попытка проанализировать в процессе онтогенеза растений происходит регуляция метаболических путей на молекулярном уровне. Дифференциальная экспрессия гена МДГ проявляется в наличии нескольких форм фермента, что может являться одним из механизмов регуляции метаболических путей в растительной клетке.

### Список литературы

1. Рахманкулова З.Ф. Взаимосвязь дыхания и фотосинтеза в норме и при стрессе у разных видов растений // Вестник Башкирского университета. 2001, № 2(1), С.68-70.
2. Cannell M.G.R., Thornley J.H.M. Modelling the components of plant respiration: some guiding principles // Annals of Botany. 2000, 85, P. 45-54.
3. Головкин Т.К. Дыхание растений. СПб. : Наука, 1999. С. 204.
4. Рахманкулова З.Ф. Уровни регуляции энергетического обмена в растениях // Вестник Башкирского университета. 2009. Т. 14. С. 1141-1154.

5. Мамушина Н.С., Зубкова Е.К., Войцеховская О.В. взаимодействие фотосинтеза и дыхания в одноклеточных морских водорослях и высших С<sub>3</sub>-растениях // Физиология растений. 1997, Т. 44, № 3, С. 449-461.
6. Lance Cl., Rustin P. The Central Role of Malate in Plant Metabolism // *Physiol. Veg.* 1984. V.22. N 5. P.625-641.
7. Backman L., Johansson G. Enzyme-enzyme complexes between aspartate aminotransferase and malate dehydrogenase from pig heart muscle // *FEBS Lett.*, 1976, V. 65, N 1, P. 39-43.
8. Cooper T.G., Beevers H. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm // *J.Biol.Chem.* 1969, V.244, № 13, P.3507-3513.
9. Hillary E.S. A Quantum Leap in mRNA Quantitation // *The Scientist*, 2000, Vol. 14, P. 22.
10. Rozen S. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers / S. Rozen, H. Skaletsky // *Methods Mol. Biol.* 2000, Vol. 132, P. 365–386.

**Попов Василий Николаевич** - проф, д.б.н., зав.кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии Воронежского государственного университета, Воронеж, тел. (473)2207533

**Мальцева Елена Валерьевна** - аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки Воронежского государственного университета, Воронеж, тел. (473)2208877

**Грабельных Ольга Ивановна** - к.б.н., старший научный сотрудник СИФИБР СО РАН, Иркутск, тел. (473)2207533

**Стробыкина Анастасия Сергеевна** - аспирант, Казанский (Поволжский) федеральный университет, Казань, тел. (843) 292-44-48

**Горшенёва Екатерина Борисовна** - аспирант, Тамбовский государственный университет, Тамбов, тел.(4752)723440

**Лебедева Ольга Петровна** - доцент, Белгородский государственный университет, Белгород

**Фоменко Олег Юрьевич** - к.б.н., зав.лабораторией, Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Россельхозакадемии, Воронеж

**Семенова Елена Васильевна** - к.б.н., доцент, Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж

**Чекменева Юлия Владимировна** - к.б.н., ассистент, Воронежская государственная лесотехническая академия, Воронеж, тел. (473)2551833

**Карпеченко Никита Александрович** - аспирант, Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции, Воронеж

**Popov Vasily N.** - professor, Head of Dept. Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, e-mail [pvn@bio.vsu.ru](mailto:pvn@bio.vsu.ru)

**Maltseva Elena V.** - PhD Student, Voronezh State University, Voronezh

**Grabelnykh Olga I.** - PhD, senior scientist, SIPBP RAS, Irkutsk

**Strobykina Anastasia S.** - PhD Student, Kazan (Povolzhsky) federal university, Kazan

**Gorsheneva Ekaterina B.** - PhD Student, Tambov state university, Tambov

**Lebedeva Olga P.** - PhD, Docent, Belgorod state university, Belgorod, e-mail [safonova2@yandex.ru](mailto:safonova2@yandex.ru)

**Fomenko Oleg Yu.** - PhD, Head of the Lab, All-Russia research veterinary institute of a pathology, pharmacology and therapy, Voronezh, e-mail [fomenych2001@mail.ru](mailto:fomenych2001@mail.ru)

**Semenova Elena V.** - PhD, Docent, Voronezh state medical academy, Voronezh, e-mail [maluzhenko@gmail.com](mailto:maluzhenko@gmail.com)

**Chekmeneva Yulia V.** - PhD, Assistant, Voronezh Forestry Academy, Voronezh

**Karpechenko Nikita A.** - PhD Student, Research institute of wood genetics and selections, Voronezh, e-mail [nikitakarpechenko@rambler.ru](mailto:nikitakarpechenko@rambler.ru)