

УДК 577.218

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНА ИЗОЦИТРАТЛИАЗЫ В ГЕНОМЕ ЖИВОТНЫХ

© 2003 г. В.Н. Попов, Е.А. Москалёв, М. Зузу, М.Ю. Шевченко, А.Т. Епринцев

Воронежский государственный университет

Разработаны праймеры для ПЦР-идентификации гена ключевого фермента глиоксилатного цикла – изоцитратлиазы (ИЦЛ). В куколке махаона *Papilio machaon L.* и нематоде *Tubifex tubifex L.* обнаружена мРНК данного фермента. Также показано, что пятисуточное голодание, по-видимому, также приводит к появлению мРНК ИЦЛ в гепатоцитах лабораторных крыс *Rattus rattus L.* Полученные данные указывают на то, что контроль экспрессии глиоксилатного цикла в животных тканях осуществляется на уровне транскрипции его ключевых ферментов. Таким образом, получено свидетельство о способности животных конвертировать липиды в углеводы, т.е. о глюконеогенезе, осуществляемом через глиоксилатный цикл.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что у животных и человека возможно превращение углеводов в липиды. Избыток углеводов, поступающих с пищей, конвертируется в липиды – более энергоёмкий субстрат, мобилизуемый организмом в неблагоприятных условиях [1].

Возможен ли обратный процесс? Могут ли липиды трансформироваться в углеводы в животных клетках? Традиционно считается, что такой способностью обладают только микроорганизмы, растения и некоторые нематоды. У перечисленных организмов на разных этапах онтогенеза активно функционирует глиоксилатный цикл (ГЦ) – метаболический путь, результатом работы которого является синтез одной молекулы сукцината из двух молекул ацетил-СоА, образующихся в результате β-окисления жирных кислот. Молекула сукцината далее может быть окислена в цикле трикарбоновых кислот до оксалоацетата – метаболического предшественника глюкозы [2]. Ключевыми ферментами ГЦ являются изоцитратлиаза (ИЦЛ; КФ 4.1.3.1) и малатсинтаза (МС; КФ 4.1.3.2). Таким образом, глиоксилатный путь участвует в конверсии жирных кислот в форму углеводов.

Ранее показано, что голодание вызывает у крыс мобилизацию наиболее доступного ресурса – гликогена, резервы которого расходуются уже к концу вторых суток пищевой депривации [3]. В то же время концентрация глюкозы в крови существенно не изменяется даже на девятые сутки голодания [4]. Следовательно, запас углеводов должен постоянно пополняться, и их наиболее вероятным источником являются липиды. Активность ИЦЛ и МС обнаружена в гепатоцитах голодающих крыс [5], эпителии мочево-

го пузыря *Bufo marinus* [6], морских двусторчатых моллюсках [7], в хрящевой ткани млекопитающих [8]. Включение витамина D в рацион индуцирует появление активностей ИЦЛ и МС в печени цыплят и крыс, предварительно выращиваемых при дефиците этого витамина. [9,10]. Известно о наличии ГЦ в бурой жировой ткани медведей в период зимней спячки [11]. Наконец, с помощью Вестерн-блот анализа определено присутствие МС в печени человека [12]. Существуют также данные, ставящие под сомнение наличие этого метаболического пути в тканях высших животных. Некоторые из них основаны на невозможности определения продуктов реакций, катализируемых ИЦЛ и МС в животных тканях [13]. Однако несмотря на устоявшееся мнение об отсутствии ГЦ в животных тканях, имеются сведения о его функционировании в экстремальных условиях.

Все ранние сведения о функционировании ГЦ в клетках животных были получены с помощью биохимических, цитохимических и ультраструктурных методов. В связи с этим нами был использован совершенно иной подход, предполагающий, что регуляция экспрессии ГЦ осуществляется на уровне транскрипции генов ИЦЛ и МС. При наличии индуцирующих факторов (голодание, витамин D) должен происходить синтез мРНК данных генов.

Целью данной работы являлась идентификация гена изоцитратлиазы в геноме животных различного уровня организации.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования служили куколка махаона (*Papilio machaon L.*), лабораторные крысы (*Rattus rattus L.*) и нематода *Tubifex tubifex L.*

Лабораторные крысы содержали при нормальном питании, а затем помещали в условия пищевой депривации на срок до 5 суток при свободном доступе к воде.

Эксперимент осуществляли в несколько этапов: экстракция суммарной РНК из животных тканей, обратная транскрипция мРНК и ПЦР-амплификация участка гена ИЦЛ.

Для выделения тотальной РНК использовали метод фенол-хлороформной экстракции РНК [14]. Для гомогенизации 1 г ткани использовали 10 мл среды, содержащей 42,6% гуанидин тиоцианат, 0,75 М цитрат натрия (рН 7), 10% саркозил, 2 мМ 2-меркаптоэтанол. К полученному гомогенату добавляли 1 мл 2 М ацетата натрия (рН 4), 10 мл водонасыщенного фенола, 2 мл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (49:1). Отделение РНК от ДНК и белка проводили центрифугированием смеси при 10000 g в течение 20 минут. Водную фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 10 мл изопропанола. Смесь инкубировали при -20°C в течение 1 часа. Осадок РНК собирали центрифугированием при 10000 g (20 мин, 4°C). Препарат РНК ресуспендировали в 3 мл среды для гомогенизации. Для повышения степени чистоты РНК добавляли один объём изопропанола и повторяли последний этап. Полученный осадок ресуспендировали в 75% этаноле, осаждали центрифугированием. РНК высушивали при комнатной температуре и растворяли в 30 мкл деионизированной воды.

Визуализацию результатов экстракции РНК проводили с помощью формальдегидного электрофореза в 1%-агарозном геле.

К суммарной РНК (1-0,2 мкг) добавляли 4 мкл 5-кратного буфера, содержащего 250 мМ Tris-HCl (рН 8,3), 375 мМ KCl, 15 мМ MgCl₂, 50 мМ DTT, и 1 мкл 2 мМ раствора dNTP. Смесь доводили деионизированной водой до суммарного объёма 15 мкл и инкубировали 3 мин при 60°C . Затем прибавляли 2 мкл раствора олиго-dT праймера, 1 мкл раствора РНКазина, 2 мкл раствора MuLV-RT обратной транскриптазы. Проводили инкубацию смеси при 37°C 1 ч и при 42°C последующие 30 мин в амплификаторе ДНК фирмы Biometra®.

Результат обратной транскрипции визуализировали с помощью агарозного гель-электрофореза ДНК в 1%-агарозном геле.

Для идентификации гена изоцитратлиазы использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специально синтезированными дегенерированными праймерами [15,16].

Состав реакционной смеси: 1 мкл ДНК-пробы, 5 мкл ПЦР буфера (100 мМ Tris-HCl, рН 8,3, 500 мМ KCl), по 1 мкл раствора праймера 1 и праймера 2, 1 мкл 2мМ раствора dNTP, 1 мкл 50 мМ раствора MgSO₄, 0,5 мкл ThermoStar ДНК-полимеразы

(20 ед/мкл), 39,5 мкл деионизированной воды. Температура отжига праймеров для кДНК махаона и *T.tubifex* 49°C , для кДНК крыс – $47-53^{\circ}\text{C}$.

Активность ИЦЛ измеряли по методу Диксона [17] при 324 нм. Среда определения содержала 50 мМ Tris-HCl буфер, рН 7,5, 2 мМ изоцитрат, 4 мМ фенилгидразин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Последовательность нуклеотидов праймеров была подобрана нами на основе анализа консервативных участков полипептидной цепи ИЦЛ из прокариот, растений и нематоды *Caenorhabditis elegans* (Рис.1). Аминокислотные последовательности были отобраны из базы данных NCBI (США) с помощью программы Pairwise BLAST. Анализ аминокислотных последовательностей проводился вручную с учетом необходимости подбора наиболее консервативных последовательностей, дающих наименьшую вариабельность (вырожденность) праймеров. Праймер 1: 5'-TGYGGNCAYATGGGNGG-3' соответствует 230-234 аминокислотным остаткам белка, выделенного из *C. elegans* и является высококонсервативной последовательностью во всех изученных организмах. Праймер 2: 5'-DCTRCARTTRTANGC-3' соответствует 354-359 аминокислотным остаткам ИЦЛ *C. elegans* и высококонсервативен для прокариот и растений. Предполагаемая длина ампликона составляет 380-390 пар нуклеотидов (п.н.).

Для всех объектов исследования успешно проведена экстракция тотальной РНК с последующей обратной транскрипцией мРНК (рис. 2, рис. 3). В ходе ПЦР с пробями комплементарной ДНК (кДНК) махаона получен продукт длиной около 380 п.н. (рис. 4). Длина ампликона соответствует величине искомого участка мРНК фермента ИЦЛ из микроорганизмов и растений. Кроме того, ампликон из махаона абсолютно совпадает по длине с таковым из кукурузы (*Zea mays L.*), синтезированным с использованием тех же праймеров. Реамплификация ПЦР-продукта, экстрагированного из геля, не приводила к уменьшению чёткости полосы, что свидетельствует о его гомогенности.

Положительный результат ПЦР-анализа свидетельствует о наличии двух уникальных последовательностей нуклеотидов в кДНК махаона, гомологичных последовательностям праймеров, которые соответствуют консервативным участкам мРНК ИЦЛ микроорганизмов и растений.

Выявление ампликона предполагаемой длины при проведении ПЦР с использованием дегенерированных праймеров позволяет утверждать о присутствии гена ИЦЛ в геноме махаона. Кроме того, параллельно контролировалась активность фермента ИЦЛ в гомогенате куколки махаона, которая составляла 8,76 ФЕ/г сырой массы (с.м.).

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНА ИЗОЦИТРАТЛИАЗЫ В ГЕНОМЕ...

<i>C. elegans</i>	41	MSSAAKNFYQVVKSAKPKGRFKGKIKRDYTVEDVLLRGSID-IDYTLATRGANKLWQLL	97
<i>S. stercoralis</i>	1	MRLKASNFYHIVKNSPKGRWTGIKRNYEIKDVLKLRGSLN-IEYTLANKTSNKLWHLI	57
<i>E. coli</i>	1	MKTRTQQIEELQKQWTPRWEGITRFPYSAEDVVKLRGSVN-PECTLAQLGAAMRWLL	57
<i>S. cerevisiae</i>	34	-----RWSKTKRNYGARDIARVRRGTFPPIEYPSVVM-ARKLFKVL	72
<i>A. thaliana</i>	33	-----RFKLTRRPYTARDVVALRGHLK-QGYA-SNEMAKKLWRTL	70
<i>C. elegans</i>	98	---HTEP---FVP-ALGAQTGNQ---AVQMVRAGLKAIYLSGWQVAADANSAGDMYPD	145
<i>S. stercoralis</i>	58	---HTEP---YVA-ALGAQTGNQ---AVQMIKAGLKAIYLSGWQVAADGNTAGDMYPD	104
<i>E. coli</i>	105	---HGESSKKGYIN-SLGALTTGGQ---ALQQAQAGTEAVYLSGWQVAADANLAASMYPD	109
<i>S. cerevisiae</i>	73	EKHHNEG---TVSKTFGALDPVQ---ISQMAKY-LDTIYISGWQCSSTASTSNEPQPD	123
<i>A. thaliana</i>	71	---KSHQ---ANG-TASRTFGALDPVQVTMMAKHLDTIYVSGWQCSSTHTSTNEPQPD	121
<i>C. elegans</i>	146	QSLYPANSGPELAKRI-----NRSLLRAD--QTEAC-----EAEDYLAQR--DW	185
<i>S. stercoralis</i>	105	QSLYPANSGPELARRI-----NKSLRRAD--QTECA-----ESDDMQPYR--DY	144
<i>E. coli</i>	110	QSLYPANSPVAVVERI-----NNTFRRAD--QIQWS-----AGIEPGDRPYVDY	150
<i>S. cerevisiae</i>	124	LADYPMDTVPNKVEHL-----FKAQLFHDRKQLEARSKAKSQEBLEDMGAPT--DY	172
<i>A. thaliana</i>	122	LADYPYDTPVKNVEHLFFAQQYHDKRQREAR--MSMSR-----EERTKTPFV--DY	168
<i>C. elegans</i>	186	YAPIVAHAFAAGFGGALNCFELMKAYIEAGAAGVHYEDQLGSEKKCGHMGCGKVLIPTAQ	243
<i>S. stercoralis</i>	145	YAPIVADCEAGFGGSLNCFEITKSYIESGVAGVHFEDQLGSEKKCGHMGCGKVLIPISE	203
<i>E. coli</i>	151	FLPIVADAEAGFGGVLNAFELMKAMIEAGAAAVHFEDQLASVKKCGHMGCGKVLVPTQE	208
<i>S. cerevisiae</i>	172	LTPIVADADAGHGGLTAVFKLTKMFIERGAAGTHMEDQTSNKKCGHMGCGRCVLPVQE	230
<i>A. thaliana</i>	169	LKPIIADGDTGFGGTTATVKLCKLFRERGAAGVHIEDQSSVTKKCGHMGCGKVLVAVSE	226
<i>C. elegans</i>	244	HIRHLNASRLAADVCGVPTIIIVARTDAESSRLTSDIDPRDHPYI-----	288
<i>S. stercoralis</i>	204	HIRHLNAARLAADVCDPTIIIVARTDAESARLLTSDIDERDHPFI-----	248
<i>E. coli</i>	209	AIQKLVAAARLAADVTVGPTLLIVARTDAADLITSDCDPYDSEPTI-----	253
<i>S. cerevisiae</i>	231	HVNRLVTIRMCADIMHSDLIVVARTDSEAAATLISSTIDTRDHYFI---VGATPNPIEP	289
<i>A. thaliana</i>	227	HINRLVAARLQFDVMGTEVTVLIVARTDAVAATLIQSNIDARDHQFILGATNPSLRGSLS	285
<i>C. elegans</i>	288	-----	288
<i>S. stercoralis</i>	278	-----	248
<i>E. coli</i>	253	-----	253
<i>S. cerevisiae</i>	290	FAEVLNDAIMSGASGQELADIEQKWCRDAGLKLFEAVIDEIERSALSNKQELIKKFTS	348
<i>A. thaliana</i>	286	SLLAEGMTVCKNGPALQSTEDQWLGSAGLMTFSEAVVQAIKRMNLENEKNQRLSEWLT	344
<i>C. elegans</i>	289	-----DYEAGRTIEGFYRLKDDSTAIQICYCIDRAIQYAP	320
<i>S. stercoralis</i>	249	-----DRKAGRTSEGFYRLKDDSTMEACIQRGIAYAP	281
<i>E. coli</i>	254	-----TGE--RTSECFR--THAGIEQATSRGLAYAP	282
<i>S. cerevisiae</i>	349	KVGPLTETSHREAKKLAKELLGHEIFFDWELPRVREGLYRYRGGT--QCSIMRARAFAP	401
<i>A. thaliana</i>	345	HARYENCLNSQGRVLAAKLGVTDLFDWDWDLPRTEGFYRFQGSVAA--AVVRGWAFAQ	401
<i>C. elegans</i>	321	YTDLIWMETSHPTIADAREFAEGVHKQYPDKMFAYNCSPSFNW-KKHLSPSQMEKFOKE	378
<i>S. stercoralis</i>	282	YCDMIWMETSYPSLSQAKEFAEGVKKREFPDKLEAYNCSPSFNW-GKHLKKSDMKQYQRE	338
<i>E. coli</i>	283	YADLVWCETSTPDLLEARRFAQAITHAKYPGKLLAYNCSPSFNW-QKNLDDKTIASFQQQ	339
<i>S. cerevisiae</i>	402	YADLVWMEISNYPDFQOAKEFAEGVKEKFPDOWLAYNLSSEFNW-PKAMSVDQHTFIQR	459
<i>A. thaliana</i>	402	IADIIWMETASPDNLECTQFAEGIKSKTPEVMLAYNLSSEFNWDASGMDTQDMVEFIPR	460
<i>C. elegans</i>	379	LGAMGFKYQFITLAGYHANSYSMFDLARNYKE-RGMLAYS-GLQEGEFAAEKHGYTAVK	435
<i>S. stercoralis</i>	339	LGAMGFKYQFITLAGYHTNSFSIFDLAKNYRE-RGMAAYA-ELQKAEFDAEKSGYTAVK	395
<i>E. coli</i>	340	LSDMGYKQFITLAGIHSWFMNFDLANAYAQOEGMKHYVEKQVQPEFAAAKDGTYFVS	398
<i>S. cerevisiae</i>	460	LGDLGYIWQFITLAGLHTNALAVHNFSDRFK-DGMKAYAQNQQREM---DDGVVDLK	514
<i>A. thaliana</i>	461	IARLGYCQWQFITLAGFHADALVVDTFAKDYAR-RGMLAY---VERIQREERTHGVDTLA	515
<i>C. elegans</i>	436	HQREVGTYGYFDAVSRVXXXXXXXXXXXXXXXXXQFQTAVRSQDEEILSLT	486
<i>S. stercoralis</i>	396	HQREVGTYGYFDVLGNACAGSSSTALTGTSTEEAQFKTTA-VEDEVMTVS	445
<i>E. coli</i>	399	HQQEVGTGYFDKVTIIQGGTSSVTALTGTSTEEESQF-----	434
<i>S. cerevisiae</i>	515	HQKWSGAEYIDGLLKLQGGVSATAMGTGVTEDQFK-----	551
<i>A. thaliana</i>	516	HQKWSGANYYDRYLKTVQGGISSTAMGKGVTEEQFK-----	552

Рис. 1. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей изоцитратлиазы из *Caenorhabditis elegans*, *Strongiloides stercoralis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*. Жирным шрифтом выделены высококонсервативные участки, праймеры разрабатывались по аминокислотам, выделенным серым фоном

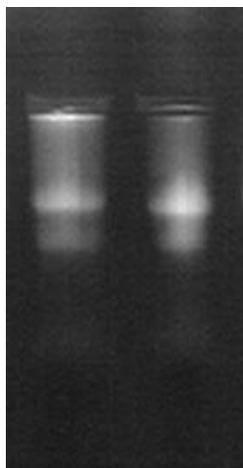


Рис. 2. Формальдегидный гель-электрофорез суммарной РНК гепатоцитов крысы

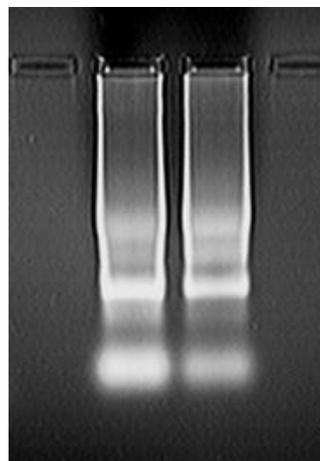


Рис. 3. Визуализация результатов обратной транскрипции мРНК махаона с помощью агарозного гель-электрофореза

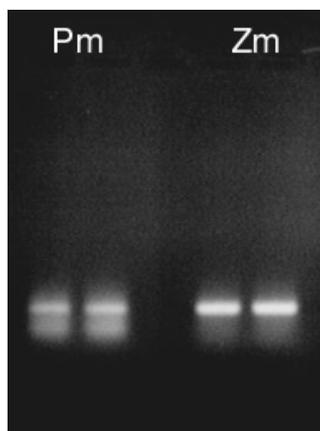


Рис. 4. ПЦР-идентификация гена ИЦЛ в махаона. Pm – махаон, Zm – кукуруза

ПЦР-анализ кДНК гепатоцитов крыс привёл к идентификации продуктов длиной около 400 п.н. (рис. 5), которая близка к величине 380 п.н.. Однако для того чтобы сделать однозначный вывод о наличии гена ИЦЛ в геноме крыс, необходимы дополнительные исследования. Повышение температуры отжига праймеров с 47 до 53°C, а также варьирование концентрации ионов Mg^{2+} (кофактор ДНК-полимеразы) не приводило к существенному увеличению чёткости полосы ПЦР-продуктов на геле. Тем не менее, в гомогенате печени обнаружена активность ИЦЛ 0.7ФЕ/г с.м..

Возможным объяснением результатов ПЦР-анализа кДНК крыс является отсутствие достаточной для амплификации гомологии между праймерами и нуклеотидной последовательностью кДНК. В ходе эволюции последовательность нуклеотидов гена фермента ИЦЛ могла сильно измениться. В результате исследуемый ген у крыс может иметь низкую гомологию с аналогичным геном растений и микроорганизмов. Фактом, подтверждающим эту гипотезу, является наличие бифункционального фермента нематоды *C. elegans*, сочетающего каталитические активности ИЦЛ и МС [18]. Учитывая, что эволюция гена ИЦЛ от микроорганизмов до нематод привела к подобной трансформации, то изменения гена у млекопитающих могли быть ещё более радикальными.

Продукты ПЦР-амплификации участка гена ИЦЛ из нематоды *T. tubifex* образуют две полосы на геле, одна из которых соответствует по длине ПЦР-продукту из кукурузы. Однако чёткость полос уступает таковой для ПЦР-продуктов из махаона и кукурузы. Видимо, это связано со слабой индукцией транскрипции гена ИЦЛ нематоды, т.к. в нашем эксперименте не использовались индуцирующие факторы.

Таким образом, данные, представленные в нашей работе, впервые свидетельствуют о наличии гена фермента ИЦЛ в геноме насекомых и позволяют

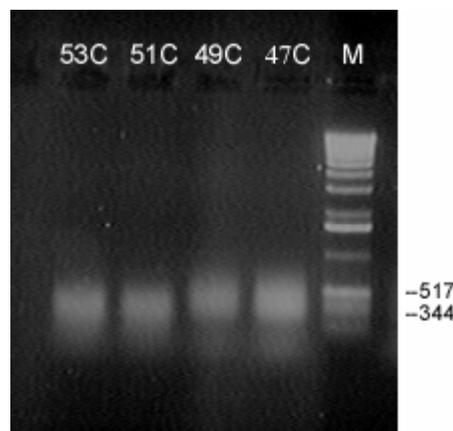


Рис. 5. ПЦР-амплификация фрагмента гена ИЦЛ крысы при разной температуре отжига праймеров. М – ДНК-маркеры

предположить его присутствие у млекопитающих. Установленное наличие мРНК ИЦЛ в животных тканях хорошо согласуется с собственными и литературными данными [4-12,19,20] о наличии в них ферментативной активности ИЦЛ.

Данные исследования частично поддержаны грантом РФФИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ленинджер А.* Биохимия. М. Мир. 1985. 1056 с.
2. *Kornberg H.L., Krebs H.B.* // Nature. 1957. Vol. 179. P. 988-991
3. *Лебкова Н.П.* Субстратное обеспечение энергетического гомеостаза при голодании // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1991. №11. С. 475-480.
4. *Попов В.Н., Волвенкин С.В., Епринцева А.Т., Игамбердиев А.У.* // Известия АН. Серия биологическая. 2000. №6. С. 672-678.
5. *Popov V.N., Igamberdiev A.U., Schnarrenberger C., Volvenkin S.V.* // FEBS Letters. 1996. Vol.390. P. 258-260.
6. *Goodman D.B.P., Davis W.L., Jones R.G.* // Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 1980. Vol. 77, №3, P. 1521-1525
7. *Benevides J.M., Tremblay G.C., Hammen C.S.* // Comp. Biochem. Physiol. B. 1989. Vol. 94(4). P. 779-782.
8. *Davis W.L., Jones R.G., Farmer G.R., Matthews J.L., Goodman D.B.* // Anat. Rec. 1989. Vol. 223(4). P. 357-362.
9. *Davis W.L., Matthews J.L., Goodman D.B.* // FACEB J. 1989. Vol. 3(5). P. 1651-1655
10. *Davis W.L., Jones R.G., Farmer G.R., Dickerson T., Cortinas E., Cooper O.J., Crawford L.B., Goodman D.B.* // Anat. Rec. 1990. Vol. 227(3). P. 271-284.
11. *Davis W.L., Goodman D.B., Crawford L.B., Cooper O.J., Matthews J.L.* // Biochim. Biophys. Acta. 1990. Vol. 1051(3). P. 276-278.
12. *Davis W.L., Goodman D.B.* // Anat. Rec. 1992. Vol. 234(4). P. 461-468.

13. *Holmes R.P.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. Vol. 1158(1). P. 47-51.
14. *Karlinsey J., Stamatoyannopoulos G., Enver T.* // *Anal. Biochem.* 1989. Vol. 180(2). P. 303-306.
15. *Mullis K.B., Ferre F., Gibbs, R.B.* *The Polymerase Chain Reaction.* Birkhauser Boston, USA. 1994.
16. *Епринцев А.Т., Москалёв Е.А., Попов В.Н.* // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2001. №1. С.9-14.
17. *Dixon G.H., Kornberg H.L.* // *Biochem.J.* 1959. V. 72. №1. P.3.
18. *Feizhou L., Thatcher J.D., Barral J.M., Epstein H.F.* // *Developmental Biology.* 1995. Vol. 169. P. 399-414.
19. *Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U.* // *FEBS Letters.* 1998. Vol.440. P. 55-58.
20. *Davis W.L., Jones R.G., Farmer G.R., Cortinas E., Matthews J.L., Goodman DB.* // *Bone.* 1989. Vol. 10(3). P. 201-206.