

УДК 577.11

ЭКСПРЕССИЯ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ НА СВЕТУ

© 2005 г. Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев, В.Н. Попов

Воронежский государственный университет

Данная статья посвящена выяснению роли цикла Кребса в зеленых листьях кукурузы. Показано, что в условиях активно функционирующего фотосинтеза цикл трикарбоновых кислот продолжает работать. Подтверждение этому получено методом полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, разработанными для сукцинатдегидрогеназы, являющейся маркерным ферментом цикла. Наличие ферментативной активности СДГ также указывает на функционирование ЦТК. Предполагается, что цикл Кребса в условиях освещения обеспечивает клетку субстратами для конструктивного метаболизма.

ВВЕДЕНИЕ

Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) занимает одно из ключевых мест в метаболизме растений. В темное время суток он обеспечивает клетку необходимой энергией в процессе темного дыхания. На свету роль поставщика энергии на себя берет фотосинтез, обеспечивая полностью энергетические потребности клетки. При этом некоторые авторы считают, что цикл Кребса в условиях фотосинтетического образования АТФ не функционирует [1]. Однако в последнее время появились работы, опровергающие данное предположение. Считается, что ЦТК не полностью ингибируется, а сохраняет небольшую активность [2, 3, 4]. Такое противоречие во взглядах свидетельствует о том, что проблема взаимоотношения фотосинтеза и дыхания является по-прежнему актуальной.

Одним из ключевых ферментов ЦТК является сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.1), которая одновременно участвует в работе митохондриальной электрон-транспортной цепи, являясь II комплексом. В связи с этим, данные об активности данного фермента позволяет судить о скорости функционирования цикла Кребса. О работе фермента можно судить не только по его физиологической активности, но и по экспрессии гена, кодирующего белковую молекулу фермента. Наличие активно транскрибируемого гена может говорить о наличии функционально активного белка. Метод полимеразной цепной реакции позволяет получить подобную информацию.

Поэтому нами была осуществлена попытка показать наличие функционально активной формы сукцинатдегидрогеназы в зеленых листьях кукурузы в условиях освещения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали 14-дневные проростки кукурузы *Zea mays* L., выращенные гидропонным способом при 16-часовом световом дне и интенсивности света 25 Дж/м²с.

Активность сукцинатдегидрогеназы определяли методом, основанным на использовании искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом [5].

Экстракция суммарной РНК из объектов исследования проводили методом с использованием гуанидин изотиоцианата, описанного в работе [6].

Обратную транскрипцию мРНК проводили в реакционной смеси объемом 15 мкл, содержащей 1-0,2 мкг суммарной РНК, реакционный буфер (50 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 375 мМ КСl, 3 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотрейтол), 0,1 мМ смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, олиго(dT) праймер, 40 ед. РНазин, 200 ед. M-MuIv обратной транскриптазы. Суммарную РНК предварительно денатурировали при 60°C в течение 3 мин. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч и при 42°C последующие 30 мин в амплификаторе ДНК фирмы Biometra®.

Последующую полимеразную цепную реакцию [7, 8] с ген-специфичными вырожденными праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия). Температура отжига праймеров для кДНК кукурузы составляла 56°C.

Использовали аминокислотные последовательности сукцинатдегидрогеназы из базы данных SwissProt (<http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>).

Выравнивание нескольких аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы AliBee – Multiple Alignment 2.0 из НИИ Физико-хи-

мической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ (http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html). Поиск гомологичных последовательностей в геномах риса, арабидопсиса, крысы, мыши и человека проводили с помощью программы BLAST (США, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Для анализа РНК и ДНК использовали 1,0% (w/v) агарозный гель, приготовленный на основе 40 мМ Трис-ацетатного буфера, рН 8,2 с 50 мМ ЭДТА. Электрофорез проводили на приборе фирмы Хеликон в буфере того же состава при напряжении 60 В в течение 50 мин. Окрашивание гелей производили раствором 0,1% бромистого этидия в 30%.

Очистку ампликона проводили с методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Полосу, соответствующую ПЦР-продукту, вырезали из геля, ДНК элюировали с помощью набора QIAEX® II Gel Extraction Kit (150) согласно рекомендациям производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нами успешно проведена экстракция тотальной РНК из зеленых листьев кукурузы с последующей обратной транскрипцией мРНК. Для экстракции РНК использовали гуанидин-изотиоцианатный метод. Применение этого вещества позволило выделить общую РНК практически без следов дегградации (рис. 1) Из приведенных данных на рисунке 1 видно, что в геле наблюдается очевидное преобладание количества 28 S рРНК над 18 S, что является одним из важных критериев качества препарата РНК.



Рис. 1. Суммарная РНК из зеленых листьев кукурузы. Пики соответствуют 28 S и 18 S рРНК.

Для проведения обратной транскрипции использовали M-MuLV -обратная транскриптаза. В качестве праймера применяли (dT)₂₀, что позволило получить ДНК, комплементарную мРНК. Использование этого метода дало возможность получить набор комплементарных ДНК с длиной от 1500 до 300 нуклеотидных пар. Полученный набор кДНК использовали в дальнейшем для проведения полимеразной цепной реакции.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей гена СДГ различных групп организмов обнаружил значительную гомологию белков. Ген-специфичные олигонуклеотидные праймеры для ПЦР-анализа были созданы на основе высококонсервативных последовательностей полипептидной цепи СДГ после проведения сравнительного анализа аминокислотных последовательностей (рис. 2). Нуклеотидная последовательность смыслового праймера соответствовала консервативному участку гена. Антисмысловый праймер был создан на основе другого высококонсервативного участка полипептидной цепи СДГ.

Проведенный ПЦР-анализ кДНК с полученными праймерами показал наличие одной полосы на геле электрофорезе, что свидетельствует о специфичности данных праймеров к гену СДГ кукурузы (рис. 3).

Специфичность праймеров была подтверждена реамплификацией экстрагированного из геля ПЦР-продукта, что подтверждается также наличием только одной полосы в геле.

Получение специфического продукта методом ПЦР в листьях кукурузы свидетельствует о наличии

arabidopsis	EDGTLHRFRSSQTILATGGYGRAYFSATS SAHTCTGDGNAMVARAGLPLQDLEFVQFHPPTG
homo	EDGSIHRIRAKNTVVATGGYGRTYFSC TSAHTSTGDGTAMITRAGLPCQDLEFVQFHPPTG
rattus	EDGSIHRIRAKNTI IATGGYGRTYFSC TSAHTSTGDGTAMVTRAGLPCQDLEFVQFHPPTG
oryza	EDGTLHRFRATNTI IATGGYGRAYFSATS SAHTCTGDGNAMVARAGLPLQDLEFVQFHPPTG
mus	EDGSIHRIRAKNTVIATGGYGRTYFSC TSAHTSTGDGTAMVTRAGLPCQDLEFVQFHPPTG

arabidopsis	IYGAGCLITEGSRGEGGILRNSEGERFMERYAPTAKDLASRDVVSRSM TMEI REGRGVGF
homo	IYGAGCLITEGCRGEGGILINSQGERFMERYAPVAKDLASRDVVSRSM TLEI REGRGCGF
rattus	IYGAGCLITEGCRGEGGILINSQGERFMERYAPVAKDLASRDVVSRSM TLEI REGRGCGF
oryza	IYGAGCLITEGSRGEGGILRNSEGERFMERYAPTAKDLASRDVVSRSM TMEI REGRGVGF
mus	IYGAGCLITEGCRGEGGILINSQGERFMERYAPVAKDLASRDVVSRSM TLEI REGRGCGF

arabidopsis	HKDHIYLHLNHL PPEVLKERLPGISETAAIFAGVDVTK EPI PVLPTVHYNMGGI PTNYHG
homo	EKDHVYLQLLHHL PPEQLATRLPGISETAMI FAGVDVTK EPI PVLPTVHYNMGGI PTNYKG
rattus	EKDHVYLQLLHHL PPEQLATRLPGISETAMI FAGVDVTK EPI PVLPTVHYNMGGI PTNYKG
oryza	LKDHIYLHLNHL PPEVLKERLPGISETAAIFAGVDVTK EPI PVLPTVHYNMGGI PTNYHG
mus	EKDHVYLQLLHHL PPEQLATRLPGISETAMI FAGVDVTK EPI PVLPTVHYNMGGI PTNYKG

Рис. 2. Сравнительный анализ фрагментов сукцинатдегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens*, *Rattus rattus*, *Oryza sativa*, *Mus musculus*. Выделенные участки последовательности соответствуют консервативным областям, использованные для конструкции праймеров.

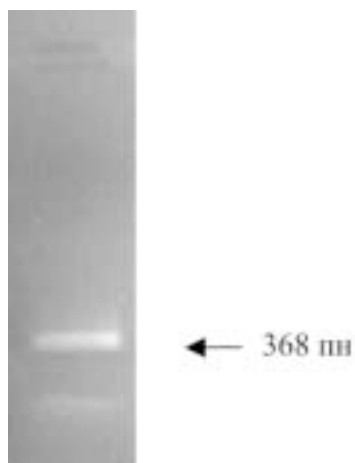


Рис. 3. ПЦР-продукт кДНК из зеленых листьев кукурузы.

только одного гена, кодирующего нуклеотидную последовательность ответственную за синтез белка сукцинатдегидрогеназы. Данный факт также подтверждает ранее высказанное предположение о том, что на свету не происходит полного торможения работы цикла Кребса [2]. Наличие ПЦР-продукта свидетельствует об активной транскрипции гена СДГ, соответственно наличие матричной РНК сукцинатдегидрогеназы предполагает наличие белковой молекулы, что не исключает вероятности ее функциональной активности. Этот факт также подтверждается обнаруженной активностью фермента в исследуемых листьях кукурузы, которая составляет 0,02 Е/мг белка или 0,03 Е/г сырой массы.

Проведенные исследования позволяют сделать заключение об активном функциональном состоянии цикла трикарбоновых кислот в зеленых растениях на свету. В таких условиях фотосинтез полностью обеспечивает клетку энергией, в то время как ЦТК не прекращает свою работу. Его скорость значительно снижается, однако ее достаточно для возможного образования различных интермедиатов клеточного метаболизма [9].

Таким образом в условиях активного функционирования фотосинтеза цикл Кребса служит, по-видимому, не генератором энергии, а является поставщиком интермедиатов для конструктивного метаболизма растительной клетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ракитин А. В.* Действие красного света в смешанном светопотоке на продукционный процесс растений. / А. В. Ракитин. – Томск. 2001. – 21с.
2. *Мамушина Н. С.* Функционирование основных этапов темнового дыхания на свету у C_3 растений с разным сезонным ритмом. / Н. С. Мамушина, Б. К. Зубкова // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, № 1. – С.30–37.
3. *Титок В. В.* Активность дыхательного метаболизма в проростках льна-долгунца. / В. В. Титок, С. И. Юренкова, Л. В. Хотылева // Физиология и биохимия культурных растений. – 2000. – Т. 32. № 3. – С.184–188.
4. *Шахов А. А.* Фотоэнергетика растений и урожай. / А. А. Шахов. – М.: Наука, 1993. – 411с.
5. *Cooper T.G.* Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity / T. G. Cooper, H. Beevers // J. Biol. Chem. – 1969. – P. 3507–3513.
6. *Chomczynski P.* Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 162. – P. 156–159.
7. *Mullis K.B.* Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction / K.B. Mullis, F.A. Faloona // Methods Enzymol. – 1987. – №155. – P. 335–350.
8. *Епринцев А. Т.* Полимеразная цепная реакция как универсальный метод диагностики и идентификации генов / А.Т. Епринцев, Е.А. Москалёв, В.Н. Попов // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2001. – №1. – С. 9–14.
9. *Епринцев А. Т.* Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов – Воронеж. : Изд-во ВГУ, 1999. – 192 с.