

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЩИТКАХ И ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ

Д. Н. Федорин, В. Н. Попов, А. Т. Епринцев

Воронежский государственный университет

Данная статья посвящена изучению уровня экспрессии генов ключевого фермента цикла трикарбоновых кислот — в щитках и зеленых листьях кукурузы. Показано, что при прорастании семян, в щитках активно экспрессируют два гена, кодирующих субъединицу А сукцинатдегидрогеназы. В зеленых листьях происходит блокирование экспрессии гена SDH1-2 и экспрессии подвергается только ген SDH1-1. Такое изменение в интенсивности экспрессии генов может свидетельствовать о необходимости синтеза большого количества фермента сукцинатдегидрогеназы в щитке для обеспечения энергией и интермедиатами растущего организма.

ВВЕДЕНИЕ

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1) — фермент одновременно участвующий в работе митохондриальной электрон-транспортной цепи, являясь **II комплексом**, и в **цикле Кребса**. СДГ состоит из 4-х субъединиц, каждая из которых кодируется определенным числом генов в геноме растений. Субъединица А (флавопротеин) в геноме арабидопсиса представлена двумя генами, расположенными в разных хромосомах. Ген SDH1-1 локализован в хромосоме 2, а ген SDH1-2 — в хромосоме 5. Субъединица В кодируется тремя генами в геноме кукурузы, также расположенными в разных хромосомах. Димер двух субъединиц А и В обладает каталитической активностью и осуществляет окисление сукцината до фумарата [1, 2]. Присоединение к димеру дополнительных белковых комплексов, являющихся цитохром *b* обогатченной фракцией, присоединяет СДГ к мембране митохондрий, где она является компонентом ЭТЦ [3].

Очень важную роль играет ЦТК при прорастании семян, когда клеткам необходимы вещества для их нормального развития. В семени кукурузы органом, где протекает основная масса процессов мобилизации запасных веществ, является щиток. В зеленом растении, в присутствии функционально активной фотосинтетической системы, функционирование и роль цикла Кребса являются дискуссионным вопросом. Некоторые ученые считают, что в таких условиях ЦТК обеспечивает клетки растений не АТФ, а субстратами для биосинтетических процессов [4, 5, 6].

Alvaro Elorza с соавторами [7] и Pablo Figueroa с соавторами [8] было показано изменение в экспрессии генов, кодирующих субъединицу В, в

процессе прорастания семян арабидопсиса. Установлено, что на 15 час прорастания происходит смена уровней экспрессии трех генов субъединицы В СДГ.

Поэтому целью нашей работы было исследование зависимости уровня экспрессии генов, кодирующих субъединицу А сукцинатдегидрогеназы в разные периоды развития кукурузы.

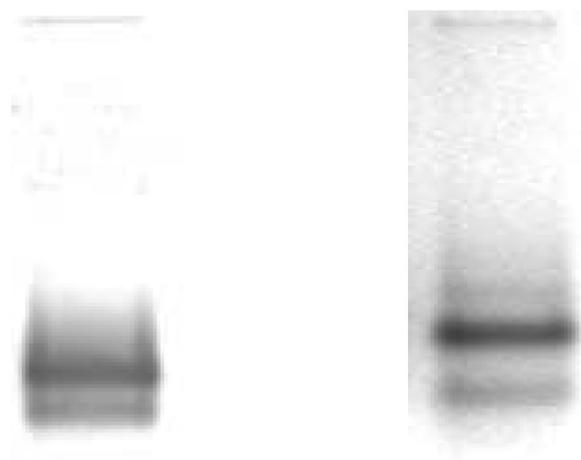
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Экстракцию суммарной РНК из объектов исследования проводили фенол-хлороформным методом с использованием гуанидин изотиоционата [9].

Обратную транскрипцию мРНК проводили в реакционной смеси объемом 15 мкл, содержащей 1—2 мкг суммарной РНК, реакционный буфер (50 мМ Трис-НСI (рН 8,3), 375 мМ КСI, 3 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотрейтол), 0,1 мМ смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, олиго(dT) праймер, 40 ед. РНазин, 200 ед. М-MuV обратной транскриптазы. Суммарную РНК предварительно денатурировали при 60°C в течение 5 мин. Далее смесь инкубировали при 37 °С в течение 1 часа и при 65°C последующие 5 мин в амплификаторе ДНК фирмы **Biometra**®.

Последующую полимеразную цепную реакцию ген-специфичными праймерами субъединицы А СДГ проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия) [10, 11]. Праймер для гена SDH1-1: прямой — 5'-GAGTTTGTTCAGTTTCATCC-3'; обратный — 5'-GTGCATTATAATATGGGTGG-3'. Для гена SDH1-



А

В

Рис. 1. Суммарная РНК из зеленых листьев кукурузы (А) и щитков кукурузы (В). Электрофорез проведен в 1% агарозном геле, окраска проводилась по реакции с бромистым этидием. Пики соответствуют 28 S и 18 S рРНК

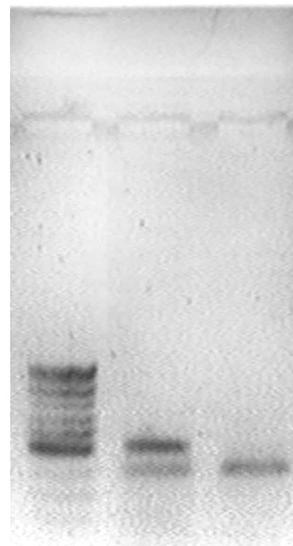
2: прямой — 5'-GAGTTTGTTC AATCCATCC-3'; обратный — 5'-GCGCCGTCTTCCTACGCCC-3'. Температура отжига праймеров для кДНК кукурузы составляла 52 °С.

Для анализа РНК и ДНК использовали 1 % (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.

Очистку ампликона проводили методом электрофореза в 1 % агарозном геле. Полосу, соответствующую ПЦР-продукту, вырезали из геля, ДНК элюировали с помощью набора QIAEX® II Gel Extraction Kit (150) согласно рекомендациям производителя. Очищенный ампликон секвенировали в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов РАН г. Пущино и сравнивали с нуклеотидной последовательностью SDH1-1 и SDH1-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракция тотальной РНК из щитков и зеленых листьев кукурузы осуществляли гуанидин-изотиоцианатный метод. На рис. 1 видно, что в геле



М

1

2

Рис. 2. ПЦР-продукты кДНК из зеленых щитков кукурузы (1) и листьев кукурузы (2). М — маркеры нуклеиновых кислот с известными длинами

наблюдается очевидное преобладание количества 28 S рРНК над 18 S рРНК в обоих образцах, что является одним из важных критериев качества препарата РНК.

Обратная транскрипция выделенной РНК и последующий ПЦР-анализ кДНК с праймерами для субъединицы А показал наличие двух полос на гель-электрофорезе в образце с кДНК щитков (365 и 600пн), тогда как при использовании в качестве матрицы кДНК зеленых листьев кукурузы, наблюдалась только одна полоса длиной 365пн (рис. 2), что свидетельствует об экспрессии разных генов. Анализ банка данных GeneBank показал, что в геноме кукурузы сукцинатдегидрогеназа кодируется двумя генами, расположенными в разных хромосомах.

Полученные ПЦР-продукты были экстрагированы из геля и очищены с помощью набора фирмы QIAEX®. Очищенный участок гена сукцинатдегидрогеназы использовали для установления его нуклеотидной последовательности и сравнения с последовательностями генов SDH1-1 и SDH1-2. Сравнение проводили с помощью программы AliBee — Multiple alignment Release 2.0. На основании сравнения нуклеотидных последовательностей

PCR-product	1	GAGTTTGTTCAGTTTCATCCTACTGCTATATATGGAGCTGGATGTCTCATCACTGAAGGA	60	A
SDH1-2	835	 GAGTTTGTTCAGTTTCATCCTACTGCTATATATGGAGCTGGATGTCTCATCACTGAAGGA	894	
PCR-product	61	GCTAGAGGTGAAGGAGGAATTCTCAGAAACAGTGAAGGTGAGAAATTCATGGATCGATAT	120	
SDH1-2	895	 GCTAGAGGTGAAGGAGGAATTCTCAGAAACAGTGAAGGTGAGAAATTCATGGATCGATAT	954	
PCR-product	121	GCTCCACGGCTAGAGATCTGGCTTCAAGAGATGTTGTTTCAAGATCAATGACTATGGAA	180	
SDH1-2	955	 GCTCCACGGCTAGAGATCTGGCTTCAAGAGATGTTGTTTCAAGATCAATGACTATGGAA	1014	
PCR-product	181	ATCCGACAAAGGACGTGGTGCAGGACCAATGAAGGATTATCTATACCTTTACTTAAACCAT	240	
SDH1-2	1015	 ATCCGACAAAGGACGTGGTGCAGGACCAATGAAGGATTATCTATACCTTTACTTAAACCAT	1074	
PCR-product	241	CTACCACCAGAAGTGCTTAAAGAGAGGGCTACCCGGTATATCTGAGACCGCAGCTATATTC	300	
SDH1-2	1075	 CTACCACCAGAAGTGCTTAAAGAGAGGGCTACCCGGTATATCTGAGACCGCAGCTATATTC	1134	
PCR-product	301	GCTGGTGTGATGTTACAAGAGAGCCAATTCCTGTATTGCCTACTGTGCATTATAATATG	360	
SDH1-2	1135	 GCTGGTGTGATGTTACAAGAGAGCCAATTCCTGTATTGCCTACTGTGCATTATAATATG	1194	
PCR-product	361	GGTGG 365		
SDH1-2	1195	 GGTGG 1199		
PCR-product	1	GAGTTTGTTC AATTCCATCCA AACTGGTATATATGGGGCCGGATGTCTCATCACCGAAGGA	60	B
SDH1-1	956	 GAGTTTGTTC AATTCCATCCA AACTGGTATATATGGGGCCGGATGTCTCATCACCGAAGGA	1015	
PCR-product	61	TCTAGAGGTGAAGGTGGTATCCTTAGAAACAGTGAAGGTGAACGTTTTATGGAACGATAT	120	
SDH1-1	1016	 TCTAGAGGTGAAGGTGGTATCCTTAGAAACAGTGAAGGTGAACGTTTTATGGAACGATAT	1075	
PCR-product	121	GCTCCTACAGCAAGGAATCTTGCATCAAGAGATGTTGTTTCAAGATCAATGACTATGGAA	180	
SDH1-1	1076	 GCTCCTACAGCAAGGAATCTTGCATCAAGAGATGTTGTTTCAAGATCAATGACTATGGAA	1135	
PCR-product	181	ATCCGACAAGGACGTGGTGCAGGACCAATGAAGGATTATCTATACCTTTACCTGAATCAT	240	
SDH1-1	1136	 ATCCGACAAGGACGTGGTGCAGGACCAATGAAGGATTATCTATACCTTTACCTGAATCAT	1195	
PCR-product	241	CTTCCTCCAGAAGTCTTAAAGGGAGGGCTCCCGGAATATCTGAGACCGCTGCCATATTT	300	
SDH1-1	1196	 CTTCCTCCAGAAGTCTTAAAGGGAGGGCTCCCGGAATATCTGAGACCGCTGCCATATTT	1255	
PCR-product	301	GCTGGTGTGATGTTACAAGAGAGCCAATTCCTGTATTGCCTACTGTGCATTATAATATG	360	
SDH1-1	1256	 GCTGGTGTGATGTTACAAGAGAGCCAATTCCTGTATTGCCTACTGTGCATTATAATATG	1315	
PCR-product	361	GGTGGTATCCCAACAACTACCATGGCGAGGTAGTTACCATCAAAGGGGATGATCCAGAT	420	
SDH1-1	1316	 GGTGGTATCCCAACAACTACCATGGCGAGGTAGTTACCATCAAAGGGGATGATCCAGAT	1375	
PCR-product	421	GCTGTGATTCTGGGCTAATGGCTGCTGGAAGAAGCAGCTTGTGCATCTGTTTCATGGCGC	480	
SDH1-1	1376	 GCAGTGATTCTGGGCTAATGGCTGCTGG-GGAGGCAGCTTGTGCATCTGTTTCATGGTGC	1434	
PCR-product	481	CAACAGGCTTGGTGCAAAATTCAGTCTGACATTGTCGATTTGGTCCGAGCTTGTGCAAA	540	
SDH1-1	1435	 CAACAGGCTTGGTGCAAAATTCAGTCTGACATTGTCGATTTGGTCCGAGCTTGTGCAAA	1494	
PCR-product	541	CAGGGTTGCAGAGATAAGCAAACAGGGGAGAAACAGAAACCTCTTGAGAAGGATGCGGG	600	
SDH1-1	1495	 TAGGGTTGCAGAGATAAGCAAACAGGGGAGAAACAGAAACCTCTTGAGAAGGATGCGGG	1554	

Рис. 3. Сравнительный анализ ПЦР-продуктов из листьев и щитков кукурузы с последовательностями генов SDH1-1 и SDH1-2. Комплиментарный участок ПЦР-продукта с длиной 365 пн с последовательностью гена SDH1-2 (А), и ПЦР-продукта с длиной 600 пн с последовательностью гена SDH1-1 (В)

тей ПЦР-продукта и генов СДГ, было установлено, что ПЦР-продукт с длиной 365 пн комплиментарен участку гена SDH1-1 *Arabidopsis thaliana*, сходство составляет 100%, а ПЦР-продукт с длиной 600 пн имеет 92% сходство с участком гена SDH1-2 *Arabidopsis thaliana*. Анализ генетического банка данных GeneBank показал, что в настоящее время идентифицирован только один ген субъединицы А сукцинатдегидрогеназы.

Полученные результаты позволяют сделать предположение о том, что в геноме кукурузы, так же как и в геноме арабидопсиса, субъединица А сукцинатдегидрогеназы кодируется двумя генами. Поскольку гены СДГ арабидопсиса расположены в разных хромосомах, SDH1-1 локализован в хромосоме 2, тогда как SDH1-2 расположен в хромосоме 5, можно сделать предположение что гены СДГ кукурузы также располагаются в разных хромосомах.

Полученные результаты свидетельствуют о регуляции экспрессии генов сукцинатдегидрогеназы в растении в процессе развития организма. В период прорастания, когда клетки зародыша нуждаются в большом количестве энергетических эквивалентов и материала для биосинтетических процессов, в клетках щитка происходит экспрессия двух генов, кодирующих субъединицу А сукцинатдегидрогеназы. Дальнейшее развитие растения приводит к изменению в экспрессии этих генов, в частности, в зеленых листьях экспрессируется только ген SDH1-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lemire B.D., Oyedotun K.S. The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002. Vol. 1553. P. 102—116.
2. Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G. and Iwata, S. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 2003. Vol.299. p. 700—704.
3. C Roy D Lancaster. Succinate:quinone oxidoreductases. *Handbook of Metalloprotein*, 2001. 25 p.
4. Мамушина Н. С. Функционирование основных этапов темнового дыхания на свету у С3 растений с разным сезонным ритмом. / Н. С. Мамушина, Б.К. Зубкова // Физиология растений. — 1995. — Т. 42, № 1. — С.30—37.
5. Шахов А. А. Фотоэнергетика растений и урожай. / А. А. Шахов. — М.: Наука, 1993. — 411с.
6. О метаболических связях между циклом Кальвина и циклом Кребса. / Заленский О. В. [и др.] // Физиол. и биохим. культурных растений. — 1985. — Т.17, № 3. — С. 253—256.
7. Alvaro Elorza. A Nuclear Gene for the Iron-Sulfur Subunit of Mitochondrial Complex II is Specifically Expressed During *Arabidopsis* Seed Development and Germination // Alvaro Elorza, Hannetz Roschztardt, Isabel Gómez, Armand Mouras, Loreto Holuigue, Alejandro Araya, Xavier Jordana. 2006. *Plant Cell Physiol*. Vol. 47. p. 14—21.
8. Figueroa P. The four subunits of mitochondrial respiratory complex II are encoded by multiple nuclear genes and targeted to mitochondria in *Arabidopsis thaliana* // igueroa, P., León, G., Elorza, A., Holuigue, L., Araya, A. and Jordana, X. *Plant Mol. Biol.* 2002. Vol. 50. p. 725—734.
9. Херрингтона С., Макги Дж. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М. : Мир, 1999. — 558 с.
10. 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.
11. Полимеразная цепная реакция как универсальный метод диагностики и идентификации генов / А. Т. Епринцев, Е.А. Москалев, В.Н. Попов // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. — 2001. — №1. — С. 9—14.