

РАЗРАБОТКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ К ГЕНАМ НАД-ЗАВИСИМОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ КУКУРУЗЫ

Н. В. Селиванова, М. О. Гатауллина, А. Т. Епринцев

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 14.04.2016 г.

Аннотация. Использование методов биоинформатики позволило нам обнаружить в геноме кукурузы 7 вероятных генов НАД-малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37), к которым нами были подобраны 7 пар специфических праймеров. Размер продукта варьируется от 167 до 229 пар нуклеотидов, а Г-Ц состав праймеров – от 50-60%. Оптимальная температура отжига праймеров равна 60° С.

Ключевые слова: НАД-зависимая малатдегидрогеназа, ген, изофермент, праймер, филогенетический анализ

Abstract. Using bioinformatics methods allowed us to detect in the genome of maize 7 probable genes NAD-malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) and choose 7 pairs of specific primers. Product size varies from 167 to 229 base pairs and GC composition of the primers - by 50-60%. Optimal primer annealing temperature is 60°C.

Keywords: NAD-dependent malate dehydrogenase gene, isozyme, primer, phylogenetic analysis

Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) является центральным окислительным путем у аэробных прокариот и эукариот [1]. Одним из ключевых ферментов ЦТК является малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.1.37), которая катализирует обратимое взаимопревращение малата и оксалоацетата (ОАА) [2]. Эукариотическая ткань содержит несколько форм МДГ, расположенных в разных субклеточных компартментах. Данный фермент встречается в глиоксисомах и пероксисомах, в митохондриях, цитоплазме и в хлоропластах. Все формы МДГ являются НАД⁺-зависимыми кроме хлоропластного фермента, который требует в качестве кофактора НАДФ [3].

Биохимические исследования и генетический анализ показали, что изоферменты растительных малатдегидрогеназ не являются продуктом одного гена. Они кодируются несколькими генами, которые могут находиться в разных хромосомах [4]. Так, например, в геноме человека гены малатдегидрогеназы (*mdh1* и *mdh2*) локализованы на участках р23 хромосо-

мы 2 и р13-q22 хромосомы 7. А в геноме арабидопсиса кодируются 8 предположительных НАД⁺-МДГ изоформ: две – пероксисомальных (*pmdh1* и *pmdh2*) [5], две – митохондриальных (*mmdh1* и *mmdh2*) [6] и одна пластидная МДГ (локализованная в пластидах НАД⁺-зависимая МДГ, *pd nad-mdh*) [7]. Остальные три изоформы не имеют обнаруживаемой последовательности-мишени и, следовательно, скорее всего являются цитозольными малатдегидрогеназами (*cmdh 1*, *cmdh 2* и *cmdh 3*). В геноме арабидопсиса находится также дополнительная НАДФ-зависимая изоформа МДГ, локализованная в пластидах [8]. Однако нами не было обнаружено информации о генах, кодирующих НАД⁺-МДГ кукурузы, кроме статей Yang et al. (1977) и David E. et al. (1981), в которых описывается 4 митохондриальных малатдегидрогеназных гена [9], тогда как в международной базе данных GenBank эти сведения не находят подтверждения.

В связи с этим целью нашей работы было осуществление поиска вероятных генов НАД-зависимых малатдегидрогеназ кукурузы и их анализ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данном исследовании использовались известные последовательности генов растения *Zea mays*, взятые из международной базы данных GenBank.

Выявление гомологии генов, кодирующих малатдегидрогеназу и сравнительный анализ их состава проводили с помощью программ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и AliBee – Multiple alignment Release 2.0 (http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html).

Выравнивание нуклеотидной последовательности осуществляли с помощью Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Филогенетическое дерево было построено с помощью программы Seaview [10] матричным методом (Distance method (Ka)) и методом наибольшего правдоподобия (PhyML (GTR)).

Для подбора праймеров использовался онлайн сервис Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В международной базе данных GenBank нами были обнаружены 6 генов НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы, локализованных в разных хромосомах. В 1 хромосоме – 2 гена: *cytMdh 1* (Gene ID: 54259) и *glyMdh* (Gene ID: 100282134), в 3 хромосоме – *cyt-likeMdh 1* (Gene ID: 103652506). Также найдены гены в 5 (*mMdh* (Gene ID: 100274264)) и 7 (*cyt-likeMdh 2* (Gene ID: 103633793)) хромосомах. *CytMdh 2* (Gene ID: 100280767) в настоящее время секвенирован не полностью, поэтому определить его локализацию не представляется возможным. Кроме того, имеется еще один неохарактеризованный ген, расположенный в 1 хромосоме и, предположительно, кодирующий НАД-МДГ – данные получены на основании автоматизированного компьютерного анализа геномной последовательности (NW_007617757.1), аннотированной с использованием метода прогнозирования гена: Gnomon. Филогенетический анализ их нуклеотидных последовательностей позволил установить степень их гомологии равную 21%. При этом гомология цитоплазматических генов составила 82%, а сходство митохондриального и глиоксисомального – 41%. Полученные результаты позволяют разделить малатдегидрогеназные гены на две большие группы: 1) цитозольные и цитоплазматические изоформы и 2) митохондриальные и глиоксисомальные малатдегидрогеназы (рис. 1).

Стоит отметить, что степень идентичности первичной структуры белка выше у изоформ, ло-

кализованных в одном компартменте, в организмах разных таксономических групп, чем между изоформами, расположенными в разных органеллах одного организма [11]. Эволюция генов МДГ, полученная при сравнении аминокислотных последовательностей, хорошо вписывается в теорию эндосимбиотического происхождения митохондрий и хлоропластов. В семействе МДГ, митохондриальный фермент более тесно связан с его прокариотическим аналогом, чем к цитоплазматическая МДГ, что предполагает более позднюю дивергенцию от общего предкового гена.

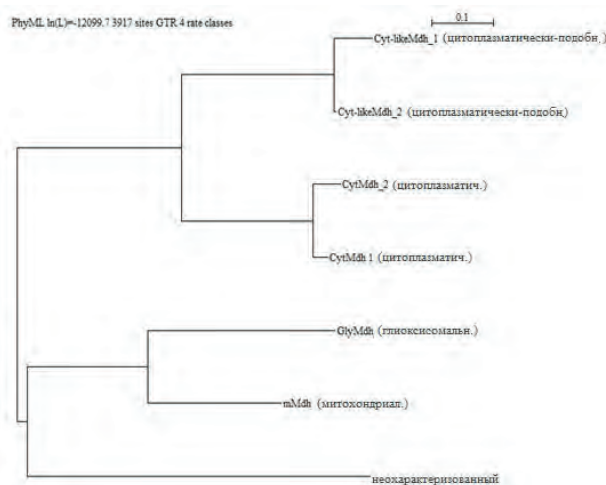


Рис. 1. Филогенетическое дерево генов НАД-зависимых малатдегидрогеназ, построенное методом наибольшего правдоподобия (PhyML (GTR)).

Степень гомологии первичной структуры митохондриальной и цитоплазматической МДГ свиньи составляет 19,6%. Для сравнения, сходство МДГ *E. coli* и митохондриальной МДГ свиньи – 58,3%, а МДГ кишечной палочки и митохондриальной МДГ дрожжей – 47,9%. Большой процент гомологии встречается между функционально значимыми остатками. Для остатков, участвующих во взаимодействии субъединиц, характерна идентичность порядка 74%, а участков связывания кофермента – 68% [3].

Подобная закономерность проявляется и при анализе нуклеотидных последовательностей. Так, например, гомология гена *sMdh1* гораздо выше к гену цитозольной малатдегидрогеназы *Oryza sativa* (84%) и *Triticum aestivum* (79%), чем к митохондриальному гену кукурузы (34%).

Обе формы МДГ синтезируются в цитоплазме, где цМДГ остается после ацетилирования N-концевого остатка. К синтезированной мМДГ достраивается N-концевая последовательность-

мишень для последующего импорта в митохондрии (Chien и Freeman 1984). Идентичность последовательностей между цМДГ и мМДГ является относительно низкой (около 20-25%), что объясняет одно из наиболее заметных различий между цМДГ и мМДГ - разницу в общей полярности двух ферментов [12].

Ферменты, которые присутствуют в глиоксисомах и пероксисомах идентичны, серологически неразличимы, имеют одинаковую изоэлектрическую точку и функционируют в качестве димеров [12].

Начальным этапом при подготовке постановки полимеразной цепной реакции является подбор праймеров к определенному гену, для успешной реализации которого необходим опыт работы с информационными базами данных, нуклеотидными последовательностями и владение основами методики подбора праймеров [13]. Анализ генов, кодирующих НАД⁺-зависимые малатдегидрогеназы позволил подобрать праймеры, нуклеотидные последовательности которых приведены в таблице.

В результате проведенной работы, нами были определены 7 пар специфических праймеров для НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы. Размер продукта варьируется от 167 до 229 пар нуклеотидов, а Г-Ц состав праймеров – от 50-60%. Оптимальная температура отжига праймеров равна 60 °С.

Таким образом, нами были найдены 7 наиболее вероятных генов НАД-зависимой малат-

дегидрогеназы кукурузы и проведен их филогенетический анализ. К исследуемым генам были подобраны олигонуклеотидные праймеры и найдена оптимальная температура их отжига, что открывает перспективу для исследования регуляции экспрессии генов, кодирующих отдельные изоформы МДГ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 14-14-00 721).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Sidhu, N.S. Structure of a highly NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase. / N.S. Sidhu, L.T. Delbaere, G.M Sheldrick. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. — 2011. — Vol. 67, № 10 — P. 856–869.
2. Изоформы малатдегидрогеназы бактерий RHODOVULUM STEPPENSEA-20S, культивируемых хемотрофно в аэробных условиях / А.Т. Епринцев [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 2016. — Том 52, №2 — Стр. 168–173.
3. Malate Dehydrogenases – Structure and Function/ P. Minárik [et al.] // Gen. Physiol. Biophys.. — 2002. — Vol.21 . — P. 257–265 .
4. Yang N.S. De novo synthesis and developmental control of the multiple gene-controlled malate dehydrogenase isozymes in maize scutella./ N. S. Yang , J.G. Scandalios. // Biochim Biophys Acta.– 1975. — Vol. 384, № 2 — P. 293–306.
5. Multiple strategies to prevent oxidative stress in Arabidopsis plants lacking the malate valve enzyme

Таблица 1.

Олигонуклеотиды для проведения ПЦР для НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы с ДНК мезофилла кукурузы.

cytMdh 1	прямой	TTTGGTCATTTTGGTGCTGA	Размер продукта 226 п.н.
	обратный	AGCTACGAAAAGCCGAAACA	
mMdh	прямой	AAGATGGTGGGACAGAGGTG	Размер продукта 196 п.н.
	обратный	TGATTGACTGGTTGCAGAGC	
glyMdh	прямой	TGGGTTGTTAGGGCTACCTG	Размер продукта 185 п.н.
	обратный	GCGATGAATTTGAAGCCATT	
cytMdh 2	прямой	TTGCATGCTCCACACTAAGC	Размер продукта 196 п.н.
	обратный	CCTGCAGAGCACAGAACAGA	
cyt-likeMdh 2	прямой	CCTGAGACTCCTGTGGAAGC	Размер продукта 229 п.н.
	обратный	TCTTCAGCGAGAGCTCCTTC	
cyt-likeMdh 1	прямой	TTCATCTGCTGCCTGTCTGT	Размер продукта 167 п.н.
	обратный	GCGATGAGGTCTTTCCTCTG	
неохарактеризованный	прямой	GCTCCAAGTTCCAAGCAAAG	Размер продукта 179 п.н.

NADP-malate dehydrogenase./ I. Hebbelmann [et al.] // J. Exp. Bot. — 2012. — Vol. 63. — P. 1445–145.

6. Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in Arabidopsis / T. Tomaz [et al.] // Plant Physiol. — 2010. — Vol. 154. — P. 1143–1157.

7. Berkemeyer M. A novel, non-redox-regulated NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of Arabidopsis thaliana L. / M. Berkemeyer, R. Scheibe, O. Ocheretina // J. Biol. Chem. — 1998. — Vol. 273. — P. 27927–2793.

8. Multiple strategies to prevent oxidative stress in Arabidopsis plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase./ I. Hebbelmann [et al.] // J. Exp. Bot. — 2012. — Vol. 63. — P. 1445–145.

9. McMillin D. E. Genetic analysis of the two groups of duplicated genes coding for mitochondrial malate dehydrogenase in Zea mays: Possible origin of Mdh genes by chromosome segment duplication/ David E. McMillin, John G. Scandalios// Molecular and General Genetics MGG. — 1981. — Vol. 182, № 2 — P. 211–221.

10. Gouy M. SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. / M. Gouy, S. Guindon, O. Gascuel// Molecular Biology and Evolution . — 2010. — Vol. 27, № 2 — P. 221–224.

11. Аль Дайни Саба Хади, Сыромятников М. Ю., Гати Моханнад Абдулраззак Гати, Епринцев А. Т. Индукция дополнительных изоформ малатдегидрогеназы и аконитатгидратазы в печени крыс в условиях аллоксанового диабета // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация, — 2012, — №1. — С.176-180.

12. Malate Dehydrogenase: Distribution, Function and Properties / R. A. Musrati [et al.] // Gen. Physiol. Biophys. — 1998. — Vol. 17. — P. 193–210.

13. Федорин Д.Н., Сазонова О.В., Епринцев А.Т. Черкасских М.В. Роль транскрипционных факторов в регуляции экспрессии фумаратгидратазной активности в кукурузе // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2015. — № 4. — С. 80-84.

*Воронежский государственный университет
Селиванова Н. В., кандидат биологических наук, ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки,*

*E-mail: kir2202@yandex.ru
Тел.: +7(473)220-88-77,*

Гатаулина М. О., аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки,

*E-mail: marina.gataullina@gmail.com
Тел.: +7(473)220-88-77*

Епринцев А. Т., заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, профессор, доктор биологических наук,

*E-mail: bc366@bio.vsu.ru
Тел.: +7(473)220-88-77*

*Voronezh State University
Selivanova N. V., Ph.D., Assistant Professor, dept. of Biochemistry and Cell Physiology*

*E-mail: kir2202@yandex.ru
Тел.: +7(473)220-88-77,*

Gataullina M. O., post-graduate student, dept. of Biochemistry and Cell Physiology

*E-mail: marina.gataullina@gmail.com
Ph.: +7(473)220-88-77*

Eprintsev A. T., Ph.D., D.Sci, head of the Biochemistry and Cell Physiology Department

*E-mail: bc366@bio.vsu.ru
Ph.: +7(473)220-88-77*