

На правах рукописи

Матниязов Рустам Тахирович



**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА БЕЛКА ХОЛОДОВОГО ШОКА
КАПУСТЫ ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ СТРЕССЕ**

03.00.03 – молекулярная биология

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Уфа – 2005

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН

Научный руководитель Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Гималов Фуат Рамазанович

Научный консультант Доктор биологических наук, профессор
Чемерис Алексей Викторович

Официальные оппоненты Доктор биологических наук, профессор
Каримова Фатима Габдуллазяновна
Кандидат биологических наук
Самигуллин Тагир Халафович

Ведущая организация Институт биологии Уфимского научного
центра РАН

Защита состоится 27 декабря 2005 г. в ____ часов на заседании
Регионального диссертационного совета КМ 002.133.01 при Институте
биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН.

Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке
Уфимского научного центра РАН.

Автореферат разослан 26 ноября 2005 г.

Ученый секретарь

Регионального диссертационного совета, к.б.н.



Бикбулатова С.М.

2006-4
29449

2261603

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Приспособление растений к условиям произрастания предполагает наличие эффективного механизма восприятия и передачи сигналов из окружающей среды. Существенным фактором внешней среды является температура, характеризующаяся очень высокой изменчивостью и значительными перепадами. В силу своей прикрепленности к месту обитания растения вынуждены приспосабливаться к этим перепадам, поскольку температурный режим обитания оказывает значительное воздействие на их метаболизм, рост, развитие и продуктивность (Boyer, 1982). Понижение температуры приводит к индукции экспрессии определенных генов. Экспрессия некоторых из этих генов носит специфический характер, поскольку вызывается только низкой температурой (Weretilnik, 1993), в то время как другие гены индуцируются, наряду с холодом, также и дегидратацией, солевым стрессом, в ответ на действие абсцизовой кислоты (Kurkela, Frank, 1990; Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 1994; Hughes, Dunn, 1996).

Многочисленные исследования показали, что развитие холодостойкости – комплексный признак, проявляющийся при слаженном действии различных систем растительного организма. В настоящее время интенсивно исследуются отдельные этапы развития стрессового ответа (трандукция сигнала, активация транскрипции генов, посттранскрипционные процессы). Однако последовательность прохождения холодового сигнала и молекулярные механизмы этого процесса изучены недостаточно полно. Удобной моделью для подобных исследований является клонированный в нашей лаборатории ген белка холодового шока капусты CSP5 (Баймиев и др., 1999), активацию экспрессии которого можно принять на нуклеотидном уровне за конечную точку в последовательности событий стрессового ответа растений.

Широкое применение для простой и удобной количественной оценки уровня экспрессии различных генов, содержащих интроны, в том числе, и гена белка холодового шока капусты CSP5, может найти разработанный метод с применением полимеразной цепной реакции в режиме реального времени



(ПЦР-РВ) с переносом энергии от праймера к праймеру, которые имеют в своем составе красители с перекрывающимися спектрами испускания и возбуждения, обеспечивающие эффект флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET-эффект, Fluorescent Resonance Energy Transfer). В результате подбора места отжига праймеров по краям соседних экзонов при амплификации молекул РНК будет наблюдаться эффект переноса энергии, а вклад геномной ДНК, за счет удаленного расположения праймеров друг от друга, будет, таким образом, полностью отсечен, поскольку в этом случае эффекта переноса энергии не будет из-за большего расстояния между красителями.

Цель и задачи исследований. Цель данной работы заключалась в исследовании молекулярных механизмов восприятия и передачи клетками растений капусты сигнала окружающей среды об изменениях температуры для активации гена белка холодового шока CSP5.

Для достижения намеченной цели были поставлены следующие задачи:

1. провести исследование влияния состояния цитоплазматической мембраны и цитоскелета на экспрессию гена CSP5;
2. изучить влияние ионов Ca^{2+} на экспрессию гена CSP5;
3. исследовать влияние активности протеинкиназ на экспрессию гена CSP5;
4. исследовать влияние 24-эпибрассинолида на экспрессию гена CSP5;
5. провести детекцию изменений в экспрессии гена CSP5 модифицированным методом ПЦР в реальном времени.

Научная новизна.

Показано, что передача низкотемпературного сигнала из внешней среды, вызывающего стрессовый ответ растения, происходит многоступенчато. Начальными этапами процесса трансдукции холодового сигнала являются активация кальциевых каналов и увеличение потока ионов кальция в цитоплазму, сопровождаемое активацией кальцийзависимых протеинкиназ, участвующих, по-видимому, в активации факторов транскрипции, задействованных в экспрессии гена белка холодового шока капусты CSP5.

Впервые было показано влияние 24-эпибрассинолида на экспрессию гена CSP5.

Показана возможность применения варианта ПЦР-РВ с переносом энергии от праймера к праймеру для исследования уровня экспрессии гена CSP5 при различных условиях низкотемпературного стресса при существенном сокращении времени эксперимента.

Полученные нами данные углубляют представления о процессах восприятия растениями холодового сигнала окружающей среды и некоторых общих механизмах адаптации растений к неблагоприятным условиям обитания.

Практическая значимость работы. Знание молекулярных механизмов развития холодостойкости и закалывания растений может послужить основой для развития новых стратегий усиления холодостойкости и увеличения продуктивности, а также для расширения области возделывания сельскохозяйственных культур. Применение варианта ПЦР-РВ с переносом энергии от праймера к праймеру значительно ускорит исследование индуцируемых внешними воздействиями генов, характеризующихся наличием интронов.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2002); XIII конгрессе FESPB (Heraklion, 2002); V съезде Общества физиологов растений (Пенза, 2003); Всероссийской научной конференции «Стрессовые белки растений» (Иркутск, 2004); Международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания объектов и методов исследования (глава 2), результатов исследования и их обсуждения (глава 3), заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающей 207 названий. Работа изложена на 110 страницах и содержит 17 рисунков.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта были взяты проростки капусты сорта Амагер, выращиваемые в питательном растворе Мурасиге и Скуга, а также протопласты, полученные из растений капусты 4-х недельного возраста. Для холодового стресса проростки и протопласты переносили в термостатированную камеру на 5⁰С и выдерживали от 15 минут до нескольких часов. ДНК из 2-х суточных проростков выделяли фенольно-детергентным методом (Graham, 1978). Тотальную РНК выделяли, используя гуанидинтиоцианатный буфер (Boothe et al., 1995). Плазмидную ДНК выделяли методом мягкого лизиса (Clewel, Helinski, 1969) с некоторыми модификациями. Расщепление ДНК проводили в буферах, рекомендованных фирмами-поставщиками. Полимеразные цепные реакции (ПЦР) проводили в ДНК амплификаторе модели Терцик (ДНК-Технология, Россия). ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с переносом энергии от праймера к праймеру проводили в приборе iCycler iQ фирмы Bio-Rad. Перенос фрагментов ДНК из гелей на нитроцеллюлозные фильтры проводили по методу Саузерна (Southern, 1975) с некоторыми модификациями (Meinkoth, Wahl, 1979). Нозерн-блот и дот-блот анализы проводили согласно стандартным протоколам (Sambrook et al., 1989). Радиоактивное мечение препаратов ДНК осуществляли с помощью γ -[³²P] АТФ и полинуклеотидкиназы фага Т4 (Maxam, Gilbert, 1977), а также используя Кленовский фрагмент ДНК полимеразы I и соответствующий [α -³²P] дНТФ (Sambrook et al., 1989). При определении активности протеинкиназ экстракцию белков проводили в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ ДТТ, 1 мМ PMSF, 250 мМ сахарозы, 10 мМ ЭДТА, 3% поливинилпирролидона, 1 мМ Na₂WO₄ (ингибитор фосфатаз). Электрофорез белков проводили по методу Laemmli (1970) в полиакриламидном геле (ПААГ) с 0.1%-ным ДДС-Na с линейным градиентом акриламида (6-16%). Количество белка определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Определение активности протеинкиназ

проводили по методу Киккавы с сотр. (Kikkawa et al., 1983). Протопласты получали из 4-х недельных проростков капусты. Иммуноферментный анализ проводили, как описано у Хайруллина и др. (1993).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Начальные этапы низкотемпературной индукции экспрессии гена белка холодового шока капусты

Механизмы передачи низкотемпературного сигнала из внешней среды, приводящего к экспрессии регулируемых холодом генов, изучены недостаточно, несмотря на значительное внимание к этой проблеме. Было показано, что при воздействии холода на клетки растений усилению экспрессии индуцируемых холодом генов предшествовали резкое повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме и увеличение жесткости клеточной мембраны (Ding, Pickard, 1993; Orvar et al., 2000; Sangwan et al., 2001). Такого состояния мембран можно было достичь также и обрабатывая их диметилсульфоксидом (DMSO) при комнатной температуре и имитируя эффект холодового воздействия на мембраны (Orvar et al., 2000; Sangwan et al., 2001). Противоположный эффект достигался при воздействии на мембраны бензиловым спиртом (Orvar et al., 2000).

В наших опытах использованы протопласты капусты, полученные из листьев растений 4-х недельного возраста. Для повышения текучести плазматической мембраны суспензию протопластов капусты (10^6 клеток на 1 мл) инкубировали в среде, содержащей в двух концентрациях - 5 и 10 мМ и не содержащей (контроль) бензиловый спирт. Из таких протопластов выделяли РНК для дот-блот-анализа. Результаты с использованием в качестве зонда меченного ^{32}P фрагмента гена белка холодового шока капусты показали, что в протопластах, инкубированных при 5°C в присутствии бензинового спирта

(БС), экспрессия гена белка холодового шока существенно ниже по сравнению с контролем (рис. 1, а). Уменьшение текучести плазматической мембраны достигалось обработкой протопластов раствором DMSO в концентрациях 1, 2 и 3%. Дот-блот-анализ мРНК, выделенных из необработанных и обработанных DMSO протопластов (10^6 клеток на 1 мл), инкубированных при различных температурах, показал стимуляцию экспрессии данного гена как в протопластах капусты, инкубированных при 23°C и обработанных раствором DMSO, так и в протопластах, инкубированных при 5°C (рис. 1, б).

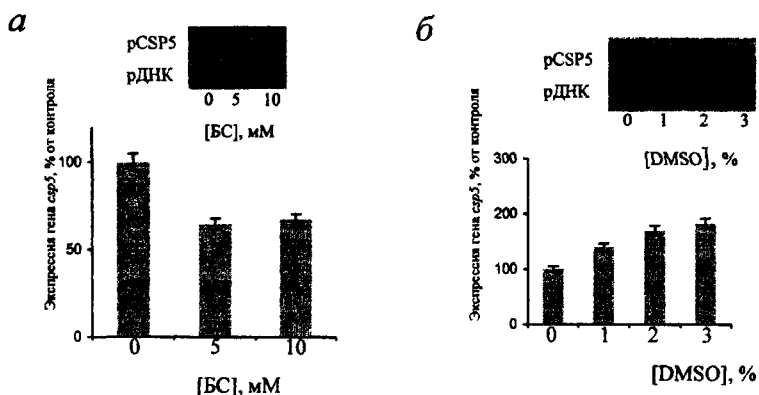


Рис 1. Экспрессия гена белка холодового шока CSP5 *Br. oleracea* в протопластах под влиянием бензилового спирта (БС, а) при 5°C или ДМСО (б) при нормальной температуре 23°C

Изменения в текучести плазматической мембраны, по-видимому, меняют силы натяжения в мембране и способствуют открыванию активируемых холодом кальциевых каналов, относящихся к механочувствительным ионным каналам (Ding, Pickard, 1993), т.е. при уменьшении текучести плазматической мембраны происходит увеличение потока ионов кальция в клетки растений.

Ранее на проростках рапса было показано, что модулирование интенсивности этого потока различными агентами отражалось на уровне экспрессии генов, регулируемых холодом (Sangwan, 2001). При обработке протопластов капусты хелатором ионов кальция EGTA уровень экспрессии

CSP5 при 5°C значительно снижался по сравнению с уровнем экспрессии этого гена на холоду в необработанных EGTA клетках (рис. 2). Однако полного подавления не наблюдалось. Отчасти это можно объяснить тем, что EGTA связывает внеклеточные ионы кальция, а общее повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме при стрессе достигается из различных депо Ca^{2+} . Воздействие на клетки при 23°C Са-ионофором A23187, стимулирующим приток в цитоплазму ионов кальция, связанных на клеточных стенках, вызывало существенное повышение уровня экспрессии CSP5 (рис. 2, а).

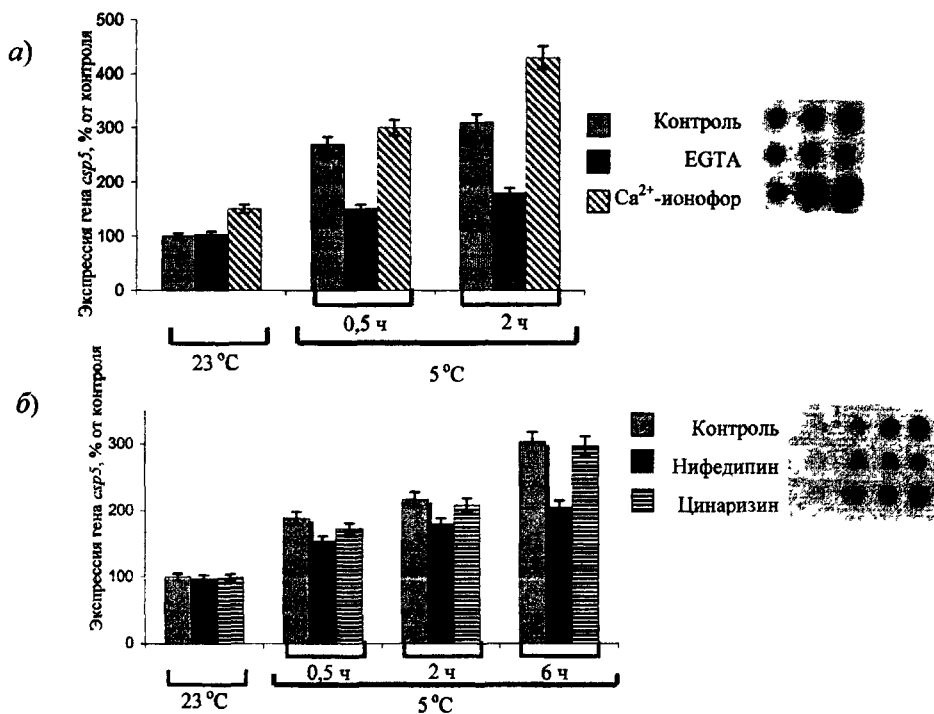


Рис 2. Влияние реагентов, меняющих поток ионов кальция в цитоплазму (а), и блокирующих кальциевые каналы (б), на экспрессию гена CSP5

Было изучено влияние на уровень экспрессии CSP5 блокаторов кальциевых каналов - нифедипина и цинаризина (рис. 2, б).

При этом нифедипин, блокирующий кальциевые каналы плазматической мембраны, оказывал эффект в подавлении экспрессии CSP5, в то время как цинаразин - блокатор каналов внутриклеточных кальциевых депо - существенного влияния на экспрессию CSP5 не оказывал.

Следовательно, изменение концентрации ионов кальция в цитоплазме прямо отражается на уровне экспрессии гена белка холодового шока капусты.

Экспрессия гена белка холодового шока капусты при различной активности кальций-зависимых протеинкиназ

Фосфорилирование белков играет важную роль в регуляции экспрессии генов у растений и отмечено при воздействии на них различных биотических и абиотических факторов, в том числе, при холодовом стрессе (Monroy et al., 1993). Известно, что эти воздействия первоначально вызывают флуктуации в концентрации ионов кальция в цитоплазме (Tahtiharju et al., 1997). Связывающим звеном между колебаниями концентрации Ca^{2+} и изменениями в экспрессии генов и метаболизме, по всей видимости, является активность кальций-зависимых протеинкиназ.

В белковых экстрактах, выделенных из растений капусты, подвергнутых холоду, и без холодовой обработки, уровень фосфорилирования гистона, взятого в качестве субстрата для протеинкиназ, заметно отличался (рис.3).

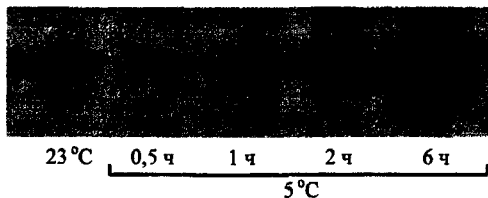


Рис 3. Фосфорилирование гистона в экстрактах клеток растений, подвергнутых низкотемпературному стрессу

Холодовой стресс вызывал повышение фосфорилирования гистона уже через 30 мин. Значительное и быстрое повышение протеинкиназной активности после помещения проростков капусты на холод выявлено и в опытах по фосфорилированию белков в реакциях *in vivo*.

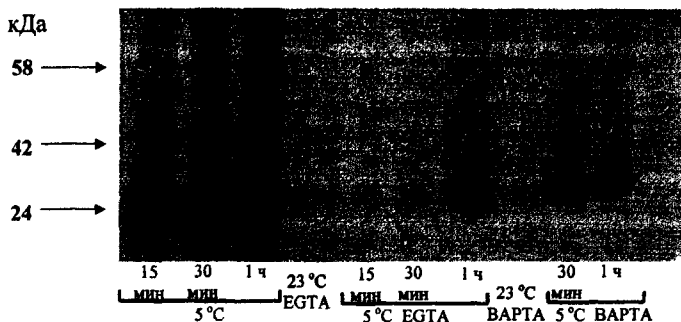


Рис 4. Фосфорилирование белков растений при низкотемпературном воздействии

При этом фосфорилируются белки с молекулярной массой 24, 42 и 58 кДа (рис. 4). В случае предварительной инкубации проростков в питательной среде с добавлением хелаторов ионов кальция EGTA и BAPTA уровень фосфорилирования белка с молекулярной массой 24 кДа существенно снижался, а белки с молекулярной массой 42 и 58 кДа на радиоавтографе не выявлялись, что подтверждает кальций-зависимый характер фосфорилирования данных белков при холодовом стрессе. В вариантах с использованием соединения BAPTA, хелатирующего ионы кальция из внутриклеточных депо, подавление фосфорилирования белков по сравнению с вариантами с EGTA меньше, что указывает на больший вклад ионов кальция, поступающих из окружающей среды, на активацию протеинкиназ при холодовом стрессе.

Необходимость этапа фосфорилирования определенных белков для экспрессии гена CSP5 подтверждается опытами с ингибиторами протеинкиназ.

На рис. 5 видно, что обработка растений стауроспорином – общим ингибитором протеинкиназ, а также вортманином, приводила к некоторому

уменьшению экспрессии CSP5 при холодовом стрессе. Однако разница в уровне экспрессии в этих вариантах не была достоверной, поэтому можно говорить лишь о тенденции к снижению экспрессии гена CSP5 при применении данных ингибиторов протеинкиназ.

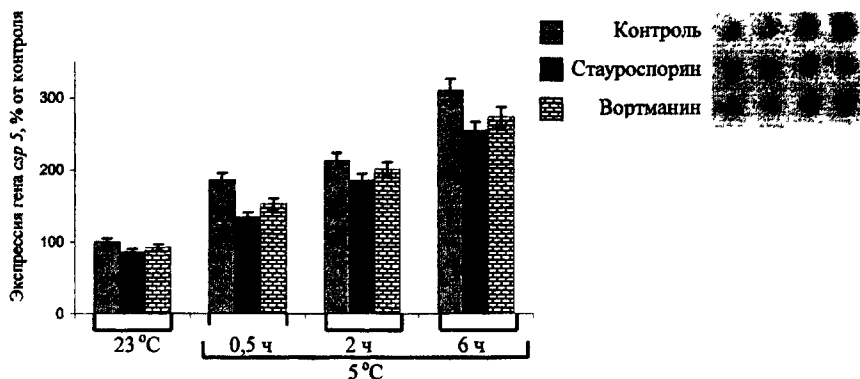


Рис 5. Влияние ингибиторов протеинкиназ на экспрессию гена CSP5

Влияние реорганизации цитоскелета на экспрессию гена белка холодового шока капусты

Известно, что компоненты цитоскелета связаны с плазматической мембраной и ионными каналами (Thion et al., 1996). Орвар и сотр. (Orvar et al., 2000) предположили, что уменьшение текучести плазматической мембраны при низкой температуре вызывает реорганизацию цитоскелета и активацию кальциевых каналов с последующей индукцией экспрессии регулируемых холодом генов. Мы также исследовали экспрессию гена белка холодового шока капусты CSP5 в протопластах из растений капусты при воздействии на них реагентов, влияющих на реорганизацию цитоскелета, в различных условиях температурного режима.

В качестве реагентов, приводящих к реорганизации тубулинового цитоскелета, использовали таксол (1 мкМ/мл) и колхицин (100 мкг/мл). Для оценки воздействия этих веществ на экспрессию гена белка холодового шока

капусты CSP5, суспензию протопластов (10^6 клеток на 1 мл) инкубировали в среде, содержащей, соответственно, таксол или колхицин.

При обработке протопластов капусты таксолом, стабилизирующим тубулиновый цитоскелет, экспрессия гена CSP5 при 5°C заметно ингибируется, оставаясь практически на уровне экспрессии этого гена при комнатной температуре (рис. 6).

О.Е.

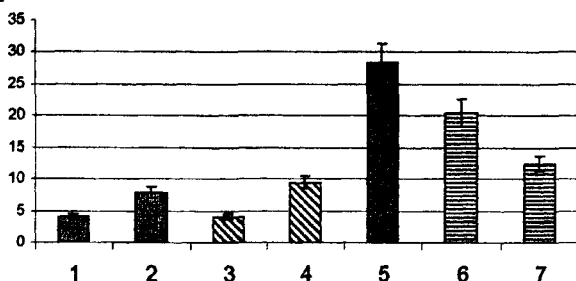


Рис 6. Оценка уровня экспрессии гена CSP5 при воздействии реагентов, влияющих на состояние цитоскелета. 1 – контроль; 2 – гипотермия; 3 – таксол+гипотермия; 4 – таксол + ДМСО; 5 – ДМСО; 6 – колхицин; 7 – колхицин + БС

В то же время стимуляция экспрессии гена CSP5 наблюдается и без низкотемпературного стресса при воздействии на протопласты капусты диметилсульфоксидом (ДМСО), уменьшающим текучесть плазматической мембраны и имитирующим холодовой стресс. В этих условиях стабилизация тубулинового цитоскелета с помощью таксола значительно уменьшает экспрессию гена CSP5, снижая тем самым эффект ДМСО.

При действии на протопласты колхицина, ингибирующего полимеризацию тубулиновых белков и разрушающего микротрубочки, наблюдается заметное увеличение экспрессии гена CSP5 даже при комнатной температуре. Обработка протопластов одновременно колхицином и бензиловым спиртом, вызывающим повышение текучести плазматической мембраны, приводит лишь к незначительному, по сравнению с действием одного колхицина, уменьшению экспрессии гена CSP5.

Реорганизация цитоскелета, по-видимому, приводит к активации кальциевых каналов, что в свою очередь обеспечивает поток ионов кальция в цитоплазму и дальнейшее прохождение холодового сигнала, завершающееся адекватным стрессовым ответом.

Влияние 24-эпибрасинолида на регуляцию экспрессии гена белка холодового шока капусты

Как известно, важная роль в регуляции интенсивности физиологических процессов, лежащих в основе роста и развития растительных организмов, отводится фитогормонам. На сегодняшний день имеются многочисленные данные о разнообразии физиологических эффектов этих соединений. В этом плане активно исследуются и брассиностероиды, близкие по своей структуре стероидным гормонам животных, впервые выделенные из липидной фракции пыльцы рапса (Grove et al., 1977). Результаты большого количества работ свидетельствуют о ярко выраженном ростстимулирующем, а также защитном действии брассиностероидов по отношению к широкому спектру неблагоприятных воздействий, что позволяет рассматривать их в качестве эффективных эндогенных регуляторов роста и развития растений (Хрипач и др., 1995; Шакирова, 2001).

Для выявления ростстимулирующего действия брассиностероидов используют специфические для них биотесты, например, стимуляцию роста второго междоузлия фасоли (Mitchell et al., 1970), также биотест по оценке скорости роста эпикотилей маша, который позволяет выявить стимулирующий эффект брассиностероидов в концентрации 10^{-10} М и ниже (Gregory, Mandava, 1982).

Предполагается, что влияние брассиностероидов на устойчивость растений к холоду и засолению связано с его действием на структуру и функции мембран (Кораблева, Платонова, 1995; Ершова, Хрипач, 1996).

Исследование влияния 24-эпибрасинолида (ЭБ) на регуляцию экспрессии гена белка холодового шока капусты, а также на рост растений капусты при низкотемпературном стрессе проводили на растениях капусты сорта Амагер на стадии появления 4-го листа. Постановку физиологических опытов с ЭБ проводили совместно с к.б.н. М.В.Безруковой.

Растения для опытов переносили в среду, содержащую 2% сахарозы и 0,4 мкМ ЭБ. Контрольные растения помещали в среду с сахарозой, но без ЭБ. В среде с ЭБ растения перед опытом выдерживали в течение 8 часов при комнатной температуре. Затем растения подвергали холодовому стрессу при 5°C в течение 1-10 дней и проводили измерения прироста биомассы.

Результаты показывают, что при понижении температуры прирост биомассы растений значительно падает (рис. 7).

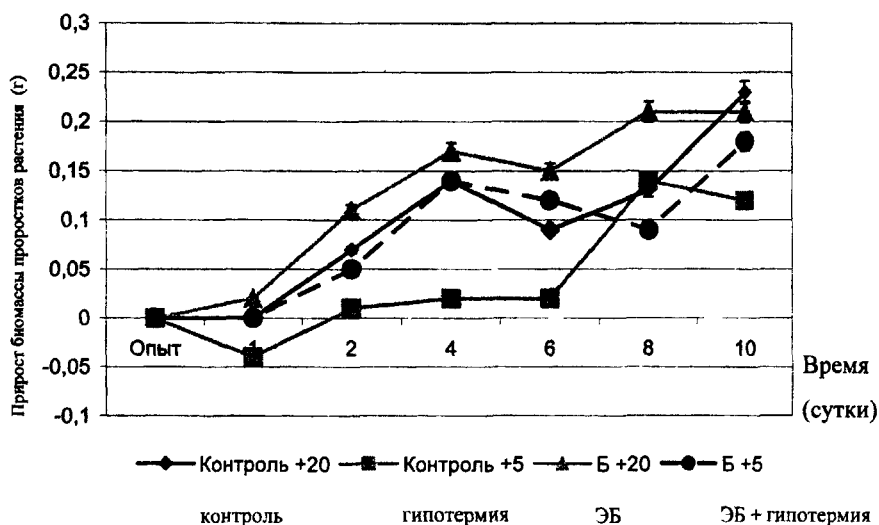


Рис 7. Влияние предобработки ЭБ на прирост проростков капусты в норме и гипотермии (5°C)

В то же время растения, предварительно обработанные ЭБ, уже на 2-й день достигают в приросте значений, близких к приросту контрольных

растений, выращиваемых при 23°C, что свидетельствует о явном антистрессовом действии 24-эпибрассинолида при понижении температуры.

Кроме того, оказалось, что 24-эпибрассинолид вызывает усиление экспрессии гена белка холодового шока капусты уже в течение 30 минут после обработки растений фитогормоном (рис. 8), сопоставимое с экспрессией данного гена при 5°C.

Высокий уровень экспрессии гена БХШ сохранялся в течение всего опыта (6 часов). Вызывая повышенную экспрессию гена белка холодового шока, соответственно, усиливая синтез самого белка, ЭБ, видимо, опять же способствует ускорению процесса адаптации растения к воздействию неблагоприятного фактора.

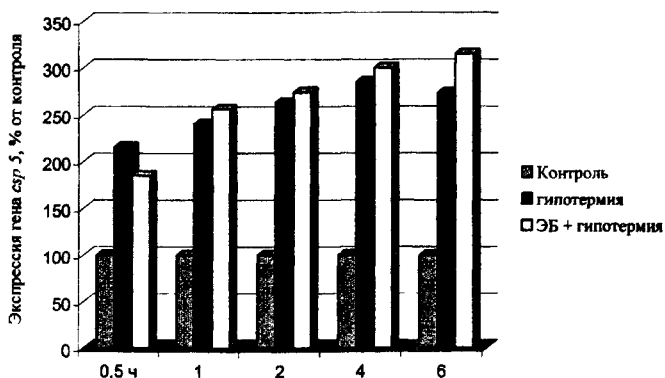


Рис 8. Влияние ЭБ на экспрессию гена CSP5

Известно, что холодовой стресс сопровождается повышением содержания в клетках растений АБК. В свою очередь, обработка растений экзогенной АБК вызывает стимуляцию экспрессии гена БХШ капусты (Баймиев и др., 1999). При одновременном воздействии холодового стресса и АБК на растения экспрессия гена БХШ была несколько выше, чем когда эти факторы действовали отдельно, но меньше их суммарного значения, что свидетельствует о существовании общих элементов в обоих путях регуляции

экспрессии гена БХШ капусты. Для того, чтобы выяснить, не опосредовано ли влияние brassinosterоидов на экспрессию гена БХШ капусты через повышение эндогенного уровня АБК, мы провели анализ динамики содержания АБК в проростках капусты при воздействии на них ЭБ. Можно видеть, что обработка ЭБ вызывала заметное увеличение в уровне АБК на протяжении всего опыта, по сравнению с содержанием АБК в контрольных растениях, выращиваемых при 23°C. Однако в предобработанных ЭБ проростках в условиях гипотермии данный показатель был существенно ниже, в сравнении с необработанными (рис. 9).

Следовательно, можно говорить о независимой от АБК регуляции

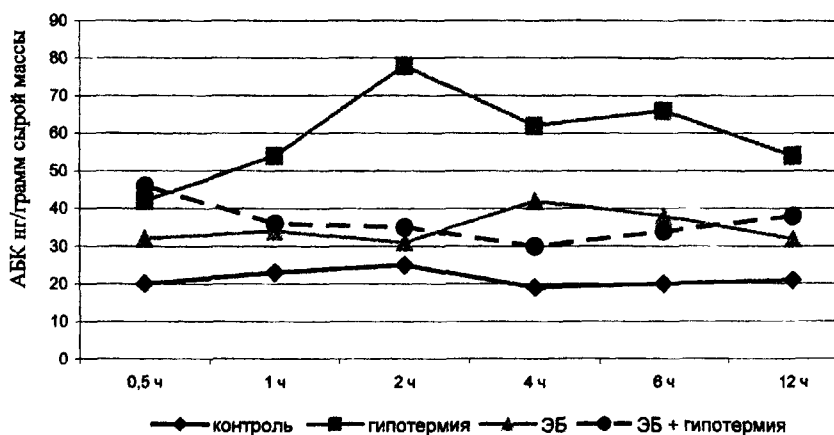


Рис. 9. Влияние предобработки 24-эпибрассинолидом на концентрацию АБК при низкотемпературном воздействии

эпибрассинолидом экспрессии гена БХШ капусты. В растениях, предварительно обработанных ЭБ, в первые 30 мин холодового стресса наблюдается определенное повышение содержания АБК, затем ее уровень падает и в дальнейшем держится на уровне содержания в контрольных растениях. Это также, очевидно, указывает на снижение повреждающего действия низких температур в результате предобработки 24-эпибрассинолидом.

Детекция специфичных фрагментов ДНК и РНК в режиме реального времени с помощью полимеразной цепной реакции

С возникновением и развитием методов ДНК-амплификации в режиме реального времени у исследователей появилась возможность с высокой достоверностью количественно оценивать содержание тех или иных молекул мРНК. Однако возникает необходимость исключения возможного вклада самих генов (то есть молекул ДНК) в ДНК-амплификацию молекул РНК. Однако, если ген, работа которого анализируется, содержит интроны, то задача значительно упрощается.

Нами разработан упрощенный и улучшенный способ детекции целевых продуктов, основанный на переносе энергии между праймерами, применяемыми при проведении полимеразной цепной реакции. При этом методе праймеры подбираются таким образом, что происходит наработка целевого продукта ПЦР размером всего 40 - 50 пн, что ускоряет реакцию амплификации ДНК. Эти праймеры несут в своих составах флуоресцентные красители, один из которых служит донором, а другой - акцептором, и эти красители представляют собой пару с перекрывающимися спектрами испускания и возбуждения, обеспечивая эффект флуоресцентного резонансного переноса энергии, называемого также FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer), от первого ко второму. Вариант ПЦР-РВ с переносом энергии от праймера к праймеру удобен для количественной оценки уровня экспрессии различных генов, содержащих интроны, так как места отжига праймеров могут подбираться по краям соседних экзонов с таким расчетом, что при амплификации молекул РНК это приведет к FRET-эффекту, а вклад геномной ДНК, за счет удаленного расположения праймеров друг от друга, будет полностью отсечен, так как в этом случае переноса энергии не будет из-за большего расстояния между красителями (рис. 10).

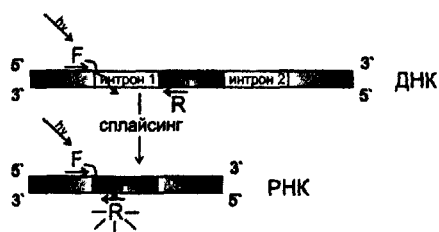


Рис. 10. Схема расположения прямого (F) и обратного (R) праймеров в варианте ПЦР-РВ с переносом флуоресцентной резонансной энергии между донорным (F) и акцепторным (R) красителями для определения уровня экспрессии генов, содержащих интроны

Этот метод использован нами для определения транскрипционной активности гена белка холодового шока капусты. Для этого были подобраны праймеры, соответствующие концевым участкам второго и третьего экзонов гена CSP5. Праймеры имели следующие последовательности: 5'-gctggagcgT(FAM)ctgctcaaac-3' и 3'-tccgatatcttcT(ROX)gtcctgcc-5'. Донорным красителем служил FAM, акцепторным – ROX, которые были пришиты к тимидину.

Реакция была проведена в 30 мкл общего объема смеси, содержащей 100 мМ трис-HCl, 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 мМ MgCl_2 , 0,01% Tween-20, 0,1 мкг тотальной РНК, по 20 пМ каждого праймера, по 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ и 1 ед. ST-ДНК-полимеразы фирмы "Costar". ПЦР проводили по схеме: начальная денатурация (95°C, 2 мин); 30 циклов амплификации со следующими параметрами: 1) денатурация – 95°C, 30 с, 2) отжиг – 48°C, 30 с, 3) синтез – 72°C, 30 с. Затем проводили инкубацию при 72°C в течение 2 мин.

ST-ДНК-полимераза обладает также и транскриптазной активностью, поэтому в реакционной среде одновременно идут реакции построения цепи ДНК на матрице РНК и построения второй комплементарной цепи ДНК. При этом нуклеотиды с пришитыми красителями FAM и ROX оказываются на достаточном расстоянии, чтобы проявился FRET эффект.

Для выравнивания исходного количества тотальной РНК использовали РТ-ПЦР с праймерами, подобранными на участок рРНК. В качестве

флуоресцентного красителя использовали SYBR Green I. С тотальной РНК после нескольких разведений проводили РТ-ПЦР. По кривым, получающимся в результате ПЦР, определялась концентрация опытных образцов тотальной РНК, что позволяло брать равное их количество для ПЦР с переносом энергии (рис. 11).

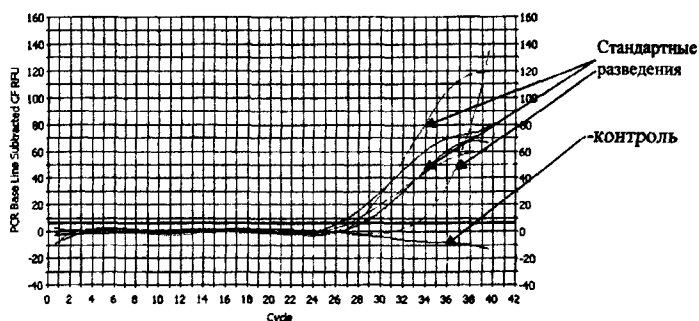


Рис. 11. Определение концентраций РНК в опытных образцах

В качестве контроля протекания реакции амплификации с возможным образованием ложного продукта в результате залипания праймеров друг на друга взята проба, содержащая только праймеры без ДНК или РНК.

После проведения ПЦР с переносом энергии проводилось плавление полученных продуктов амплификации, при этом постепенная денатурация амплификата приводит к снижению свечения (рис. 12).

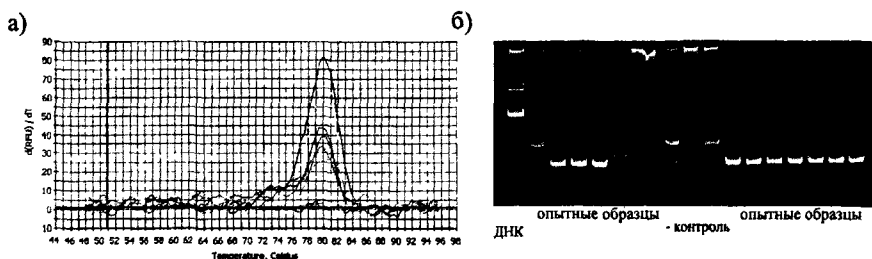


Рис. 12. Кривая плавления продуктов амплификации (а); электрофоретическое разделение амплификатов в ПААГ (б)

Для измерения количества амплификатов проводили плавление стандартных проб, представляющих собой разведения предварительно синтезированного олигонуклеотида – полноразмерного продукта РТ-ПЦР с известной концентрацией (рис. 13).

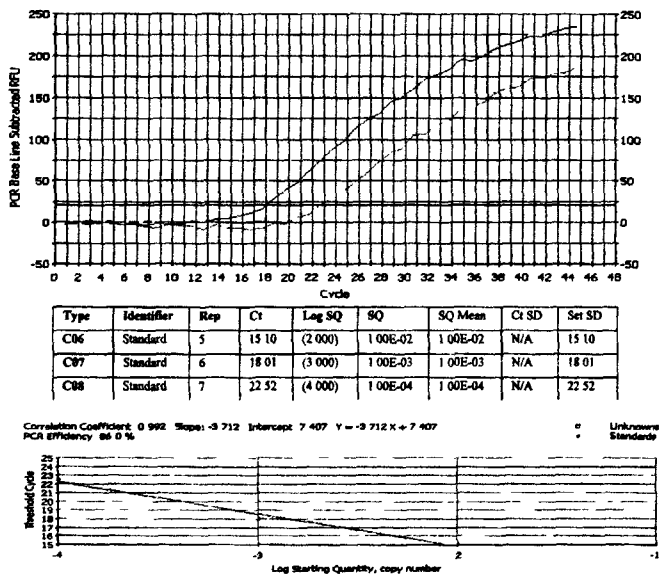


Рис. 13. Проведение амплификации со стандартными разведениями контроля: а – синтез амплификатов; б – количественные данные; г – стандартная кривая

Количественные характеристики полученных кривых плавления стандартных разведений использовались программным обеспечением прибора для измерения количества продуктов амплификации в опытных образцах.

Таким путем получены результаты по экспрессии гена CSP5 при изменении потока ионов кальция в цитоплазму и воздействии ингибиторов протеинкиназ (рис. 14).

Сравнение этих результатов с теми, которые были получены ранее общепринятыми методами (иммобилизация РНК на нитроцеллюлозных фильтрах, гибридизация меченными ^{32}P фрагментами гена CSP5, сканирование гибридизационных точек с помощью денситометра) (рис. 2а и 5), показало, что применение варианта ПЦР-РВ с переносом энергии от праймера к праймеру для

исследования уровня экспрессии гена CSP5 при различных условиях низкотемпературного стресса, отражает складывающуюся при этом ситуацию.

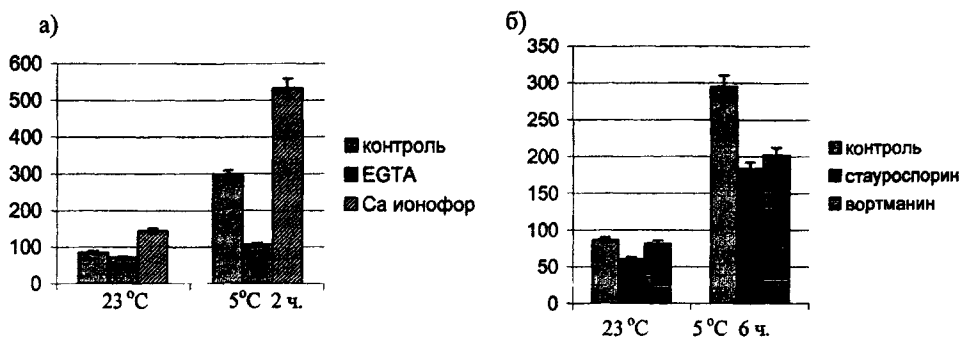


Рис 14. Экспрессия гена CSP5 при изменении потока ионов кальция в цитоплазму (а), и при ингибировании протеинкиназ (б) (по результатам, полученным с помощью метода ПЦР-РВ)

Но этот подход быстрее по времени, менее трудоемок в силу автоматизации процесса, кроме того, в данном случае нет необходимости применения радиоактивных изотопов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что передача низкотемпературного сигнала из внешней среды происходит многоступенчато. Начальными этапами являются активация кальциевых каналов и увеличение потока ионов кальция в цитоплазму, сопровождаемое активацией кальций-зависимых протеинкиназ, участвующих, по-видимому, в активации факторов транскрипции, задействованных в экспрессии гена белка холодового шока капусты CSP5.
2. Доказана роль процессов реорганизации цитоскелета в активации экспрессии гена белка холодового шока капусты CSP5.
3. Впервые показана стимуляция экспрессии гена CSP5 под влиянием 24-эпибрассинолида.
4. Использование гена белка холодового шока капусты CSP5 как маркерного гена, чутко реагирующего на понижение температуры, показало

возможность применения варианта ПЦР-РВ с переносом энергии от праймера к праймеру для исследования уровня экспрессии гена CSP5 при низкотемпературном стрессе при существенном сокращении времени эксперимента.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гималов Ф.Р., Баймиев Ан.Х., Матниязов Р.Т., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Начальные этапы низкотемпературной индукции экспрессии гена белка холодового шока капусты // III съезд биохимического общества. 2002. Санкт-Петербург. С. 395-396.
2. Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Гималов Ф.Р. Влияние активности протеинкиназ на экспрессию гена CSP 5 // 6-я Пущинская школа - конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». 2002. Пущино. Т.1. С. 278.
3. Гималов Ф.Р., Баймиев А.Х., Матниязов Р.Т., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Начальные этапы низкотемпературной индукции экспрессии гена белка холодового шока капусты // Биохимия. 2004. Т 36, №5. С. 575-579.
4. Гималов Ф.Р., Вахитов В.А., Чемерис А.В., Матниязов Р.Т., Баймиев А.Х. Влияние реорганизации цитоскелета и изменения активности протеинкиназ на экспрессию гена белка холодового шока капусты // Стрессовые белки растений. Материалы Всероссийской научной конференции. Иркутск. 2004. С. 31-34.
5. Гималов Ф.Р., Матниязов Р.Т., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Влияние фитогормона эпибрассинолида на регуляцию экспрессии гена белка холодового шока капусты // Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». 2005. Вологда. С. 45.
6. Матниязов Р.Т., Гималов Ф.Р., Баймиев А.Х., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Новые технологии амплификации нуклеиновых кислот в режиме реального времени для изучения транскрипционной активности отдельных генов // Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». 2005. Вологда. С. 111.

№ 25187

РНБ Русский фонд

2006-4
29479

Матниязов Рустам Тахирович

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА БЕЛКА ХОЛОДОВОГО ШОКА КАПУСТЫ
ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ СТРЕССЕ**

Специальность 03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.

Подписано в печать 24.11.2005

Отпечатано на ризографе.

Формат 60x84 1/16. Усл.-печ. л. 1,5. Уч.-изд. л. 1,7

Тираж 100 экз. Заказ № 313.

450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3,

ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет РОСЗДРАВА»