

**Смекенов И.Т.¹, Аюпов Т.И.², Бахтамбаева М.К.³,
Рахматуллаева Г.Т.⁴, Тайпакова С.М.⁵, Бисенбаев А. К.⁶**

¹PhD-студент, младший научный сотрудник, e-mail: smekenovizat@gmail.com

²⁻⁴студент бакалавриата, стажёр-исследователь,

e-mail: timur220505@gmail.com bakhtambayeva.marzhan@gmail.com; guliza9676@gmail.com

⁵PhD, ведущий научный сотрудник, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

⁶доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК,

главный научный сотрудник, e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии,
Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

**КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ
κДНК Rht-D1a ПШЕНИЦЫ В E. coli**

DELLA белки пшеницы кодируются генами Rht-1 и имеют три гомологичных локуса (Rht-A1, Rht-B1 и Rht-D1) в 4A, 4B и 4D хромосомах, соответственно. Несмотря на важность Rht-1 белков, практически не проводились биохимические исследования, в основном из-за трудностей с очисткой достаточного количества белка и отсутствия специфичных к этому белку антител. В представленной работе выделена κДНК гена Rht-D1a с применением реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Осуществлена функциональная экспрессия Rht-D1a с гистидиновым концом в E. coli и очищена никель-аффинной хроматографией до гомогенного состояния. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии установлено полное совпадение аминокислотной последовательности рекомбинантного белка с первичной структурой Rht-D1a белка Triticum aestivum. Выявлено, что продуктом экспрессии гена является глобулярный белок массой 65,3 kDa, состоящий из 623 аминокислот (pI=4,99). С применением очищенных рекомбинантных белков RHT-D1a были получены поликлональные антитела и выявлена их специфичность к Rht-D1a белку пшеницы. Полученные нами очищенный Rht-D1a белок и специфичные к нему поликлональные антитела подходят для дальнейших структурных и функциональных исследований, которые будут способствовать четкому пониманию механизма регуляции роста растений через Rht-D1a белки.

Ключевые слова: Triticum aestivum, Rht-D1a, DELLA, экспрессия.

Smekenov I.T.¹, Ayupov T.I.², Bakhtambayeva M.K.³,
Rakhmatullaeva G.T.⁴, Taipakova S.M.⁵, Bisenbaev A.K.⁶

¹PhD-student, junior researcher, e-mail: smekenovizat@gmail.com

²⁻⁴bachelor-student, trainee researcher,

e-mail: timur220505@gmail.com; bakhtambayeva.marzhan@gmail.com; guliza9676@gmail.com

⁵PhD, leading researcher, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

⁶doctor of biological science, professor, member of NAS of RK, chief researcher,

e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems,
Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Cloning and expression of wheat Rht-D1a cDNA in E.coli

The wheat DELLA proteins encoded by the plant height reducing (Rht-1) genes. Wheat DELLA genes have three homologous loci (Rht-A1, Rht-B1, and Rht-D1) in the 4A, 4B, and 4D chromosomes, respectively. Despite the importance of the Rht-1 proteins, little biochemical analyses have been reported, mainly due to difficulties with purification of sufficient quality of protein and absence specific antibodies to this protein. Here, we isolated the Rht-D1a cDNA gene encoding the wheat Rht-D1a using the

reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR). Rht-D1a with a 6xHis end was functionally expressed in *E. coli* and purified by nickel affinity chromatography. Using MALDI-TOF mass spectrometry, a complete coincidence of the amino acid sequence of the recombinant protein with the primary structure of the DELLA protein *Triticum aestivum* was established. It was revealed that the product of gene expression is a globular protein with a mass of 65.3 kDa, consisting of 623 amino acids (pI 4.99). Purified Rht-D1a was used as an immunogen to generate rabbit polyclonal anti-Rht-D1a antibodies. Our purified preparation of the wheat Rht-D1a and antibodies generated against the recombinant Rht-D1a is suitable for further structural and functional studies that will contribute to precise understanding of the plant regulation mechanism through Rht-D1a proteins.

Key words: *Triticum aestivum*, Rht-D1a, DELLA-protein, aleurone, expression.

Смекенов И.Т.¹, Аюпов Т.И.², Бахтамбаева М.К.³,
Рахматуллаева Г.Т.⁴, Тайпақова С.М.⁵, Бисенбаев А. К.⁶

¹PhD-докторантура студенті, кіші ғылыми қызметкер, e-mail: smekenovizat@gmail.com

²⁻⁴бакалавриат студенті, зерттеуші-тәжірибе жинақтаушы,
e-mail: timur220505@gmail.com; bakhtambayeva.marzhan@gmail.com; guliza9676@gmail.com

⁵PhD, жетекші ғылыми қызметкер, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

⁶биология ғылымдары докторы, профессор, ҚР-ҰҒА академигі, бас ғылыми қызметкер,
e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Биология және биотехнология мәселелерінің ғылыми-зерттеу институты,
әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Бидай *Rht-D1a* кДНК генін *E.coli* жүйесінде клондау және экспрессиялау

Бидайдың DELLA белоктары Rht-1 гендерімен кодталады. Rht-1 гендерінің 4A, 4B, және 4D хромосомаларында үш гомологиялық локустары (Rht-A1, Rht-B1 және Rht-D1) бар. Rht-1 белоктарының маңыздылығына қарамастан, жеткілікті мөлшерде белок бөліп алу қиындықтары мен белокқа қарсы антиденелердің болмауына байланысты биохимиялық зерттеулер қажетті деңгейде жүргізілмеді. Ұсынылып отырған жұмыста кері транскрипция және полимеразды тізбекті реакциялары көмегімен Rht-D1a кДНК гені бөлініп алынды. Гистидин соңды Rht-D1a *E. coli* жүйесінде функциональді экспрессияланып, никель аффинді хроматография көмегімен гомогенді күйде бөлініп алынды. MALDI-TOF масс-спектрометрия көмегімен рекомбинантты белоктың аминқышқылдық тізбегінің *Triticum aestivum* Rht-D1a белогының біріншілік құрылымымен толық сәйкестігі анықталды. Ген экспрессиясының өнімі молекулалық массасы 65,3 kDa болатын және 623 аминқышқылынан тұратын (pI = 4,99) глобулярлы белок екені айқындалды. Тазаланып алынған рекомбинантты RHT-D1a белогының қолданылуымен поликлональді антиденелер алынып, олардың бидай Rht-D1a белоктарына арнайылығы анықталды. Гомогенді күйде бөлініп алынған Rht-D1a белогы және спецификалық поликлональды антиденелер, Rht-D1a белогын құрылымдық және функционалдық зерттеулер жүргізуге мүмкіндік береді, олай болса Rht-D1a арқылы өсімдіктердің өсуінің реттелу механизмін нақты түсінуге түрткі болады.

Түйін сөздер: *Triticum aestivum*, RHT-D1a, DELLA-белок экспрессия.

Введение

Ген пшеницы Rht-1, предопределивший успех «зеленой революции» и используемый при создании низкорослых и устойчивых к полеганию сортов пшеницы, кодирует белок с высококонсервативным DELLA доменом (Peng J., 1999: 256-261). Большинство карликовых форм культурных растений содержат мутации в генах, кодирующих DELLA-белки. Такие мутации весьма перспективны для использования в селекции, поскольку они не оказывают влияния на жизнеспособность и размножение растений (Ueguchi-Tanaka M., 2007: 183-198; Cheng H., 2004: 1055–1064). Белки DELLA являются репрессорами роста растений, впервые идентифицированы в *Triticum aestivum*, и встречаются во всех

сельскохозяйственных растениях, включая рис (*Oryza sativa*), ячмень (*Hordeum vulgare*), кукуруза (*Zea mays*), пшеница (*Triticum aestivum*) и виноград (*Vitis vinifera*) (Peng J., 1999: 256-261; Ueguchi-Tanaka M., 2007: 183-198; Boss P.K., 2002: 847-850; Chandler P.M., 2002: 181-190; Gubler, F., 1992: 3591-3595; Itoh H., 2002: 57-70, Phillips S., 2012: 4-6). В арабидопсисе DELLA-белки RGA и GAI (Silverstone A.L., 1998: 155-169) действуют как отрицательные регуляторы передачи сигналов гибберелловой кислоты (ГК), и аналогичные роли предполагаются для SLR1 в рисе (Ikeda A., 2001: 999-1010; Dai C., 2010:1916-1927) и SLN1 в ячмене (Chandler P.M., 2002: 181-190). Показано, что ГК индуцирует деградацию DELLA белков. Деградация DELLA белка, индуцированная ГК совместно с рецептором GID1 и бел-

ком F-бокса, играют ключевую роль в передаче сигналов ГК (Feng S., 2008: 475-479; Fu X., 2002: 3191-3200). Когда ГК отсутствует, DELLA белки подавляют различные эффекты ГК в растениях, включая экспрессию гена α -амилазы. При связывании молекулы ГК с рецептором GID1 индуцируется его взаимодействие с DELLA-белком и F-боксом, содержащим белки SLY/GID2. В результате DELLA-белок присоединяется к убиквитин-лигазному комплексу SCF^{SLY/GID2}, что стимулирует его убиквитин-зависимый протеолиз DELLA-белка. Этот основной путь для ГК-индуцированной деградации DELLA-белков показан в рисе (Itoh H., 2005: 669-679, Gomi K., 2004: 626-634) и ячмене (Gubler, F., 1992: 3591-3595). Установлено, что ГК-индуцированная деградация DELLA в растениях арабидопсис стимулирует рост растений (Dill A., 2001: 777-785). DELLA белки являются не только ключевыми компонентами цепи сигнальной трансдукции, которые регулируют рост растений в ответ на ГК (Alvey L., 2005: 153-160, Yamaguchi S., 2008: 225-251, Gilroy S., 1992:3591-3595), но также являются интеграторами сигналов от других факторов регулирующих рост растений.

Гексаплоидная пшеница (AABBDD) является основной продовольственной культурой. DELLA белки пшеницы кодируются Rht-1 генами который впервые были выделены Peng et al. (Peng J., 1999: 256-261). Rht-1 гены имеют три гомологичных локуса (Rht-A1, Rht-B1, and Rht-D1) в 4A, 4B и 4D хромосомах, соответственно (Pearce S., 2011:1820-1831). Выявлены несколько мутантных вариантов Rht-B1/Rht-D1 придающих карликовость и потерю чувствительности к ГК (Pearce S., 2011:1820-1831; Wu J., 2011:2120-2130). Показано, что мутантные варианты Rht-B1b, Rht-B1c и Rht-D1b снижают ГК-зависимое взаимодействие между GID1 и DELLA (Pearce S., 2011:1820-1831; Wu J., 2011:2120-2130; Chandler P.M., 2008: 285-294). В пшенице, хотя взаимодействие между Rht-1 и GID1 наблюдались в двухгибридных системах дрожжей (Wu J., 2011:2120-2130; Lou X., 2011:e0157642), белок Rht-1 до сих пор не обнаружен в тканях пшеницы из-за отсутствия подходящих инструментов.

Понимание на молекулярном уровне белок-белковых взаимодействий между белками Rht-1 и другими потенциальными компонентами сигнальных систем является критически важным в расшифровке механизмов роста растений и для понимания функций белков Rht-1. В связи с этим экспрессия в гетерологичных системах гена Rht-

1 позволяет получать большие количества целевого белка для получения специфичных антител, мощных инструментов в характеристике функции гена и белок-белковых взаимодействий в трансдукции сигналов роста растений.

Целью представленной работы является выделение и характеристика кДНК гена, кодирующего RHT-D1a и функциональная экспрессия His-меченного кДНК гена RHT-D1a в *E.coli*.

Материалы и методы исследования

Материалы исследования. Объектом исследования явились нуклеиновые кислоты, выделенные из пшеницы сорта Саратовская 29.

В ходе работы использовали клеточные линии: NovaXG Zappers (F- *mcrA* Δ (*mcrC-mrr*) *endA1 recA1* ϕ 80*dlacZAM15* Δ *lacX74 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL nupG* λ - *tonA*) для наработки плазмидной ДНК и экспрессионный штамм Rosetta(DE3) pLysS (F- *ompT hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pLysSRARE (Cam^R) фирмы «Novagen» (Германия).

Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma» (США), «Amresco» (Германия), «Serva» (Германия) и «Реахим» (Россия). В ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (США), «New England Biolabs» (Англия), «Thermo Fisher Scientific» (США), «Promega» (США), «Roche» (США).

Выделение тотальной РНК из листьев пшеницы. Для выращивания растений пшеницы сорта Саратовская 29, зерна стерилизовали в растворе 1%-го гипохлорида натрия в течение 10 мин. Затем несколько раз промывали в стерильной воде и помещали в чашки Петри со 100 г стерилизованного песка и замачивали в 20-25 мл деионизированной воды. Растения выращивали в условиях длинного светового дня (≥ 14 ч) при 22°C. Через 5 дней растения использовали для выделения нуклеиновых кислот. Для выделения РНК брали 100 мг проростков пшеницы и гомогенизировали в заранее охлажденной фарфоровой ступке в присутствии 1,3 мл TRI реагента (Sigma-Aldrich, США). Гомогенат переносили в микропробирку и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 минут при 4°C. Супернатант перенесли в стерильную пробирку и добавили 300 мкл холодного хлороформа и перемешивали путем инвертирования пробирки, затем инкубировали на льду в течение 3 минут. Далее центри-

фугировали при 12000 об/мин в течение 15 минут при 4°C. Верхнюю водную фазу осторожно перенесли в новую пробирку и добавили 0,5 мл холодного изопропилового спирта. После перемешивания раствор инкубировали 10 минут на льду и центрифугировали при 12000 об/мин 10 минут при 4°C. Супернатант удаляли пипеткой и осадок промывали в 1 мл 75% этанола. Образец осаждали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 5 минут при 4°C и сушили при комнатной температуре в течение 10 минут. Осадок растворяли в 30 мкл dH₂O. Концентрацию и качество выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США) и агарозного гель-электрофореза. Образец хранили при -70°C.

Выделение мРНК. Объем препарата тотальной РНК довели до 600 мкл с dH₂O. Препарат инкубировали в течении 5 мин при 65°C в водяной бане, затем к препарату добавили 500 мкл двухкратного связывающего буфера (1 М NaCl, 20 мМ Tris pH 7,5, 2 мМ EDTA, 0,1% ДСН). Полученную смесь переносили в пробирку с промытой олиго-dТ целлюлозой и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре на качалке. Смесь центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 минут, удаляли супернатант. Осадок промывали два раза однократным связывающим буфером и два раза промывочным буфером (0,2 М NaCl, 10 мМ Tris pH 7,5, 1 мМ EDTA, 0,05% ДСН). мРНК элюировали с помощью олиго-dТ целлюлозы, добавлением 250 мкл буфера для элюции и инкубированием при 37°C в течении 5 мин. Далее смесь центрифугировали и осторожно отбирали супернатант в чистую пробирку. Повторяли элюцию. Объединяли элюаты и доводили объем водой до 200 мкл. Для осаждения поли-А РНК к раствору добавляли 40 мкл 5 М ацетата аммония, 2,5 объема этанола и инкубировали при -70°C в течение 30 минут, или на ночь на -20°C. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 50 мкл dH₂O.

Реакция обратной транскрипции. Для синтеза кДНК на матрице мРНК, в стерильную пробирку добавляли в указанной последовательности: РНК (1-500 нг поли-А РНК), праймер (15-20 пмоль ген-специфичного праймера) и затем объем довели до 12,5 мкл стерильной dH₂O. Реакционную смесь прогревали при 70°C в течение 5 минут и охлаждали на льду. Далее, к смеси добавляли (в указанной последовательности): 4 мкл пятикратного реакционного буфера (250 мМ Tris-HCl pH 8,3 при 25°C, 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl₂, 50 мМ DTT), 0,5 мкл (или 20 ед.)

RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 мкл 10 мМ смеси dNTP (конечная концентрация 1мМ), 1 мкл (или 200 ед.) RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Латвия). Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Затем смесь осторожно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Реакцию проводили в течение 1,5 часов при 42°C на водяной бане. Реакцию останавливали прогреванием в течении 10 мин при 70°C. Полученный продукт хранили при -20°C.

Полимеразная цепная реакция. Для получения в достаточном количестве кДНК использовали метод ПЦР. К 2 мкл реакционной смеси обратной транскрипции добавляли олигонуклеотиды, являющиеся прямым и обратным праймерами до конечной концентрации 0,2 мМ. Далее в смесь добавляли 12,5 мкл 2X PCR Master mix (Fermentas, Латвия), содержащие 0,625 единиц Taq ДНК полимеразы в буфере (750 мМ Tris HCl, pH 8,8, 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween 20), 50 мМ MgCl₂ и 5 мМ каждого dNTP, а также 15,5 мкл деонизированной стерильной воды на 25 мкл реакции. Продукты ПЦР анализировали в 1% агарозном геле и затем очищали методом элюции из геля.

Индукция экспрессии Rht-D1a гена под контролем T7 промотора в E.coli и очистка рекомбинантного белка

Для индукции экспрессии рекомбинантного белка под контролем T7 промотора в клетках *E. coli* несколько колоний трансформированных клеток выросших на чашках Петри с селективной средой инокулировали в 20 мл LB-среды с канамицином в концентрации 50 мкг/мл и культивировали при 37°C и интенсивной аэрации (180 об/мин на качалке) в течение ночи. Затем ночную культуру ресуспензировали в 1 л жидкой LB с канамицином. Рост бактериальной культуры проводили при 30°C до достижения оптической плотности OD₆₀₀ ~0,6. При достижении необходимой плотности индукцию проводили в присутствии ИПТГ в конечной концентрации 0,2 мМ. Отбор проб для анализа проводили до и после индукции с ИПТГ в течение 12 часов (ночная культура) центрифугированием при 6000 об/мин в течении 7 мин при 4°C. Осажденные клетки ресуспензировали в зависимости от объема клеток в 10-15 мл буфера для хранения (20 мМ HEPES pH-7,6 с 40 мМ NaCl) и хранили при -20°C.

Рекомбинантный белок с His-концом был очищен металлоаффинной хроматографией на ионах никеля (Ni²⁺) с использованием NiTrap Chelating колонки объемом 1 мл и после элюи-

рован из колонки с помощью имидазола в градиенте 20-500 мМ с регистрацией оптической плотности на длине волны 280 нм. Электрофорез белков, приготовленных кипячением образцов в 2х образцовом буфере, проводили в полиакриламидном геле по методу Лэммли (Laemmli U.K., 1970:680-5).

Получение антител к белку DELLA и иммуноблоттинг

Анти- поликлональные антитела были получены против полноразмерного рекомбинантного His-меченного DELLA белка. Около 1 мг очищенного рекомбинантного DELLA белка эмульгировали в равном объеме полным адьювантом Фрейнда и вводили подкожно кроликам. Вспомогательные инъекции антигена в неполном адьюванте Фрейнда проводились каждые две недели. У кролика брали образец крови до первой инъекции, а затем через 7 дней после последней четвертой инъекции для получения иммунной сыворотки. Через неделю после последней инъекции кровь собирали и иммунную сыворотку очищали иммуноаффинно посредством набора Protein A agarose Fast Flow resin (Sigma, США). В качестве первичных антител использовали очищенное поликлональное антитела к DELLA белку, а в качестве вторичных антител – козьи анти-кроличье иммуноглобулины, конъюгированный с пероксидазой хрена. Для иммуноблоттинга приблизительно 50 мг свежей ткани листа или корня 14-дневных проростков замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в 250 мкл ледяном буфере для экстракции белков, содержащего 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 100 мМ KCl, 15% глицерина, 1 мМ DTT, 0,01% NP-40, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 5 мкг·мл⁻¹ лейпептина и 1 мкг·мл⁻¹ антипаина. Полученный лизат центрифугировали при 13000 г в течение 1 часа при 4°C для осаждения клеточных остатков. Супернатант переносили в новую пробирку и концентрацию белка в каждом образце определяли методом Брэдфорда (Bradford M. M. 1976:248-254) перед нанесением на гель.

Экстракты растений (12 мкг белка) фракционировали в 10%-ном ДСН-полиакриламидном геле и затем белки переносились из полиакриламидного геля на PVDF мембрану (Pierce, США) с использованием Bio-Rad Mini-transblot Cell (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя. После переноса белка, мембрану осторожно встряхивали в блокирующем растворе, содержащем 5% молока и 0,1% Tween-20 в 1x TBS (трис-буферный солевой раствор: 50 мМ Трис-HCl pH 7,5, 20 мМ NaCl) в течение 1 часа

при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора мембрану инкубировали в 10 мл аффинно-очищенном анти-atPARP поликлональном антителе (разведение 1:10000 в блокирующем растворе 0,1% Твин-20) в течение ночи при 4°C. Мембрану промывали пять раз в 10 мл буфере для промывки (1xTBS, 0,1% Tween-20) в течение 5 мин, каждый раз. После промывки, мембрану инкубировали в 10 мл растворе вторичных антител (разведение 1:20000 в блокирующем растворе с 0,1% Твин-20) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембрану промывали пять раз в 10 мл растворе для промывки в течение 5 мин каждый раз. Раствор субстрата готовилась путем смешивания равного объема раствора пероксида и раствора люминала/усилителя. Мембрану инкубировали в растворе субстрата в течение 2 мин в темноте и белковые полосы проявляли на пленке Kodak X-Omat (США).

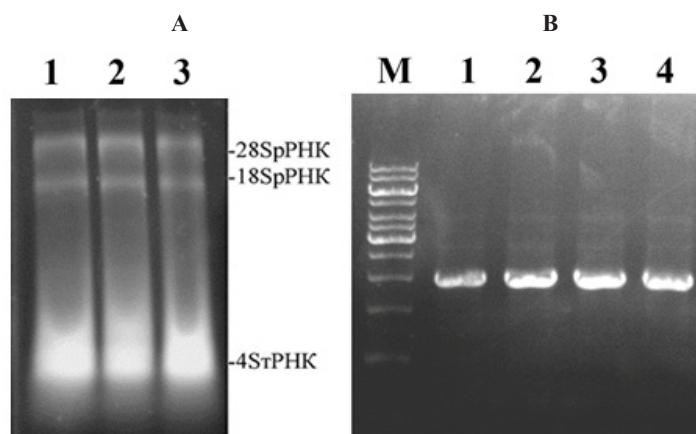
Результаты исследования и их обсуждение

Нами был проведен компьютерный анализ нуклеотидной последовательности кДНК гена *Rht-D1a* длиной 1872 пар нуклеотидов (номер HE585643.1 в GenBank), кодирующего Rht-D1a белок длиной 623 аминокислот с расчетной молекулярной массой 65,3 кДа и изоэлектрической точкой (ИЭТ) около 4,99.

На основании анализа нуклеотидной последовательности мРНК (кДНК) гена *Rht-D1a* проведен расчет и осуществлен синтез олигонуклеотидных праймеров для амплификации вышеуказанного гена из пшеницы сорта Саратовская 29 на матрице, соответствующей мРНК с применением реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Последовательности этих олигонуклеотидных праймеров следующие: смысловой праймер *Rht-D1a* Dir: 5'-ATCCGAATTCATGAAACGTGAGTACCAGG-3' и антисмысловой праймер *Rht-D1a* Rev: 5'-TCGATAAGCTTTACGGACCAGC-3' с подчеркнутыми сайтами рестрикции *EcoRI* и *HindIII*, соответственно. Сайты выбирались с учетом рамки считывания плазмиды. В качестве источника мРНК для реакции ОТ-ПЦР были выбраны 5-дневные проростки пшеницы сорта Саратовская 9. Тотальный препарат РНК выделяли из 5-дневных проростков растений тризольным методом, как описано в разделе методы исследования. Электрофоретический анализ РНК на 0,8% агарозном геле показал наличие 28S рРНК и 18S рРНК и 4S рРНК (Рисунок 1А). Отношения

A260/A280 и A260/A230 были 1,9 и 2,0, соответственно. Это свидетельствует о высоком качестве препарата и низкой загрязненности изолированных образцов белковыми компонентами и вторичными метаболитами. Далее препарат РНК использовали для амплификации *Rht-D1a* кДНК гена с применением сайт специфических праймеров с помощью реакции обратной транскрипции

(РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Условия проведения этих реакций указаны в разделе «Материалы и методы исследования», а результаты приведены на рисунке 1Б. Из приведенной электрофореграммы видно, что главным продуктом амплификации является кДНК с ожидаемым размером около 1800 пар нуклеотидов, соответствующий длине кДНК *Rht-D1a*.



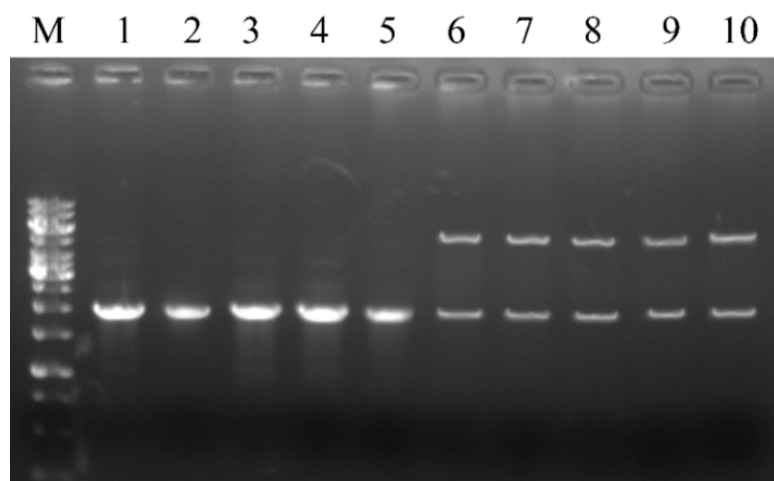
А – Препараты тотальной РНК: 1-3 – суммарный препарат рибонуклеиновых кислот. Справа указано положение 28S рРНК, 18S рРНК и 4S рРНК. Б – РОТ-ПЦР продукты: М – маркерные ДНК. 1 и 2 – продукты РОТ и ПЦР

Рисунок 1 – Препараты нуклеиновых кислот, выделенных из проростков пшеницы и РОТ-ПЦР продукты

В следующих экспериментах, для функциональной экспрессии кДНК гена *Rht-D1a* в прокариотической системе нами был выбран вектор рЕТ28с (Novagen, Германия), который обладает необходимыми для экспрессии генов качествами: сильным, *lac* индуцибельным промотором бактериофага T7, с 6xHis-tag последовательностью на С-конце, что позволяет аффинной очистке белкового продукта на основе никель-основанной хроматографии и подходящей для вставки емкостью, и простотой селекции. Для создания рекомбинантной ДНК-конструкции продукт ОТ-ПЦР *Rht-D1a* кДНК клонировали в плазмиду рЕТ28с по сайтам рестрикции *EcoRI* и *HindIII*. Полученную конструкцию рЕТ28с/*Rht-D1a* трансформировали в *E. coli* штамма NovaXG Zappers для наработки рекомбинантной плазмиды. Селекцию клонов проводили на агаризованной среде LB с канамицином (50мкг/мл). Далее плазмидная ДНК, выделенная в соответствии с протоколом набора GeneJET Plasmid Miniprep

Kit (Thermo Fisher Scientific, США), была использована для тестирования клонов на наличие рекомбинантных плазмид, содержащих в своем составе ген *Rht-D1a* с помощью рестрикционного и ПЦР анализа.

Результаты рестрикционного анализа плазмиды представлены на рисунке 2. Как видно из рисунка клоны, содержащие плазмиды рЕТ28с/*Rht-D1a* при обработке эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *HindIII* на 1% агарозном геле дают четко выраженные две полосы с длиной около 5,4 и 1,8 т.п.н. По размеру первая полоса соответствовала длине плазмиды рЕТ28с без вставки, а вторая длине гена *Rht-D1a* (Рисунок 2, дорожки 6-10). При проведении ПЦР анализа с использованием ген-специфических праймеров и плазмидной ДНК, выделенных из трансформантов, фрагменты, обнаруженные в результате агарозного гель-электрофореза полностью соответствовали длине клонированного гена *Rht-D1a* (Рисунок 2, дорожки 1-5).



1-5 – ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды pET28c/Rht-D1a;
6-7 – Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pET28c/Rht-D1a; M: ДНК маркер

Рисунок 2 – Анализ клонов, трансформированных pET28c/Rht-D1a штаммов *E. coli* на наличие рекомбинантной плазмиды

В результате скрининга удалось идентифицировать 5 колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Определение нуклеотидной последовательности показал полное соответствие первичной структуры гена ранее опубликованной нуклеотидной последовательности гена *Rht-D1a T. aestivum*.

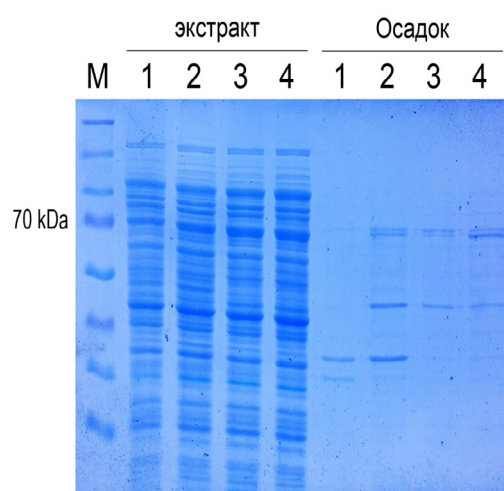
Для идентификации продукта гена *Rht-D1a* в клетках *E. coli* использовали систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7. Для синтеза DELLA белка *T. aestivum* в бактериальных клетках нами был выбран экспрессионный штамм *E. coli* Rosetta(DE3), разновидность штамма К-12. Этот штамм содержит в хромосоме копию гена, кодирующий Т7 РНК полимеразу под контролем *lacUV5*-промотора. Rosetta(DE3)pLysS создан на основе штамма BL21 *lacZY* для увеличения экспрессии эукариотических белков содержащих редко используемые в *E. coli* кодоны. Этот штамм содержит гены тРНК к следующим кодонам: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA в устойчивых к хлорамфениколу плазмиде.

Экспрессию гена *Rht-D1a* трансформированных в клетках *E. coli* штамма Rosetta(DE3)pLysS, выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Индукцию проводили в присутствии ИПТГ в конечной концентрации 0,2 мМ. Отбор проб для

анализа проводили до и после индукции с ИПТГ в течение 12 часов. Электрофорез белковых образцов, приготовленных кипячением клеточных лизатов в 2х образцовом буфере, проводили в 10% ДСН-ПААГ в Трис-глициновом буфере при 12 V/см.

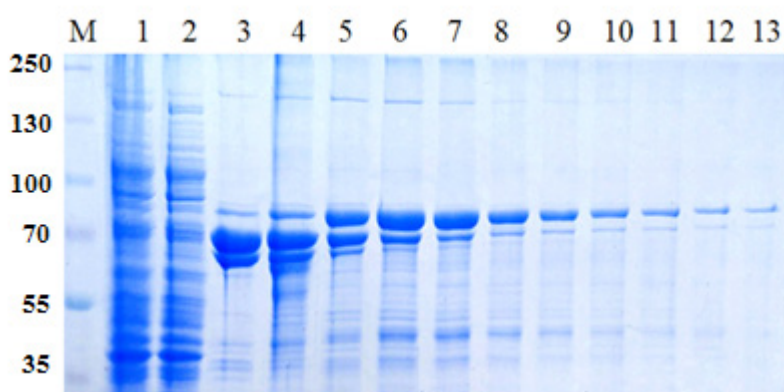
По результатам ДСН-ПААГ электрофореза удалось установить, что рекомбинантный штамм продуцирует белок с молекулярной массой 70 кДа, что незначительно выше предсказанной молекулярной массы Rht-D1a белка. В отсутствие индуктора накопление белка с соответствующей молекулярной массой не происходило (Рисунок 3). Что свидетельствует об эффективной экспрессии гена *Rht-D1a*.

Так как для экспрессии кДНК *T. aestivum* в *E. coli* был выбран вектор pET28c с 6xHis-tag последовательностью на С-конце, экспрессированный рекомбинантный белок содержал шесть идентичных гистидиновых остатков на С-конце, которые действуют как сайт связывания металлов для очистки белков. В связи с этим, рекомбинантный белок с His-концом был очищен металлоаффинной хроматографией. Степень очистки полученного белка определяли с ДСН-ПААГЭ (Рисунок 4). Как видно из представленных данных рекомбинантный DELLA белок очищен до гомогенного состояния и не содержал примесей других белков.



М – Маркер; 1 – клеточный экстракт *E. coli* несущий пустой вектор рЕТ28с; 2-4- клеточный экстракт *E. coli* несущий рЕТ28с/Rht-D1a после 12 ч индукции с ИПТГ

Рисунок 3 – Экспрессия кДНК гена Rht-D1a *T. aestivum* в *E. coli*



А – Очистка на Ni-NTA матрице для белков, содержащих гистидиновую метку.
М – белковый маркер. 1 – Неиндуцированный клеточный лизат. 2 – Индуцированный клеточный лизат. 3 – Проскок через колонку NiTar; 4-8 – Очищенные фракции белка. 9-13 – дополнительная очистка на гепариновой колонке.

Рисунок 4 – Аффинная хроматография экстракта клеток *E. coli*, экспрессирующих DELLA-His6 белок

На следующем этапе для установления природы детектируемых белков мы провели масс-спектрометрический анализ (MS). Для этого очищенный с помощью аффинной хроматографии рекомбинантный белок разделили при помощи ДСН-ПААГ электрофореза. После окрашивания гелей куммасси G-250 полосы, расположенные в зоне предполагаемого нахождения **Rht-D1a**, вырезали и отправили на анализ. Данные MS под-

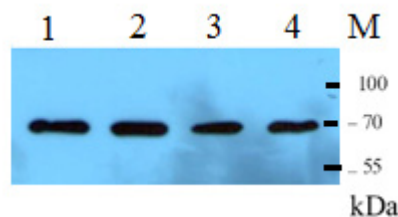
твердили, что рекомбинантный белок с высокой долей вероятности является DELLA белком.

Для обнаружения белка **Rht-D1a** в растениях требуется получение специфических антител к данному ферменту. Для этого очищенный рекомбинантный белок Rht-D1a совместно с адьювантом Фрейнда ввели в кровотока кролика. После серии иммунизации была отобрана необходимое количество крови, из которой вы-

делена сыворотка, содержащие антитела к Rht-D1a. Далее при помощи SulfoLink Immobilization Kit (Thermo Fisher Scientific, США) проведена очистка антител к Rht-D1a.

В последующих экспериментах для выявления Rht-D1a в проростках пшеницы семена выращивали 4 дня. Затем экстрагировали

белок и белки фракционировали с помощью ДСН-ПААГЭ. Далее переносили белки из полиакриламидного геля на PVDF мембрану и инкубировали ее с поликлональными антителами к Rht-D1a. При этом хроматографически очищенные рекомбинантные Rht-D1a использовали в качестве контроля.



Рекомбинантный очищенный белок Rht-D1a.
2-4- Клеточный экстракт проростков *T. aestivum*

Рисунок 5 – Анализ специфичности анти-Rht-D1a поликлональных антител

Как видно из рисунка 5, анти-Rht-D1a антитела выявил Rht-D1a, как белковую полосу с молекулярной массой приблизительно 70 кДа.

Заключение

В результате проведенных работ нами был выделен *Rht-D1a* кДНК ген методом ОТ-ПЦР и и успешно экспрессирован в *E. coli* под контролем T7 промотора. Анализ ДСН-ПААГ показал,

что Rht-D1a представляет собой основной белок, продуцируемый в *E. coli* с молекулярной массой 65,3 кДа, что соответствует массе белка предсказанной на основе аминокислотной последовательности. MALDI-TOF масс-спектрометрия предполагаемого рекомбинантного белка и его анализ с использованием NCBI BLAST показали, что фермент содержит предполагаемые консервативные домены присущие DELLA белку *T. aestivum*.

Литература

- Peng J., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintham J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F., Sudhakar D., Christou P., Spape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. «Green Revolution» genes encode mutant gibberellin response modulators // *Nature*. – 1999. – Vol. 400, No. 6741. – P. 256-261. DOI: 10.1038/22307.
- Ueguchi-Tanaka M., Nakajima M., Motoyuki A., Matsuoka M. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 58, No. 1. – P. 183-198. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103830.
- Cheng H., Qin L., Lee S., Fu X., Richards D.E., Cao D., Luo D., Harberd N.P., Peng J. Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function // *Development*. – 2004. – Vol. 131, No 5. – P.1055–1064. DOI:10.1242/dev.00992.
- Boss P.K., Thomas M.R. Association of dwarfism and floral induction with a grape «green revolution» mutation // *Nature* – 2002. – Vol. 416, No. 6883. – P. 847-850. DOI: 10.1038/416847a.
- Chandler P.M., Marion-Poll A., Ellis M., Gubler F. Mutants at the Slender1 locus of ‘Himalaya’ barley: molecular and physiological characterization // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 129, No. 1. – P. 181-190. DOI: 10.1104/pp.010917.
- Gubler, F., Chandler, P.M., White, R.G., Llewellyn, D.J., and Jacobsen, J.V. Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 129. – P. 191–200. DOI: 10.1104/pp.010918.
- Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., Sato Y., Ashikari M., Matsuoka M. The gibberellin signaling pathway is regulated by appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei // *Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14, No. 1. – P. 57-70. DOI: 10.1105/tpc.010319.
- Phillips S. and Norton R. Global Wheat Production and Fertilizer Use // *Better Crops*. – 2012. – Vol. 96, No. 3. – P. 4-6.
- Silverstone A.L., Ciampaglio C.N., Sun T. The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway // *Plant Cell*. – 1998. – Vol. 10, No. 3. – P. 155-169. DOI: 10.1105/tpc.10.2.155.

Ikeda A., Ueguchi-Tanaka M., Sonoda Y., Kitano H., Koshioka M., Futsuhara Y., Matsuoka M., Yamaguchi J. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8 // *Plant Cell*. – 2001. Vol. 13, No. 5. – P. 999-1010.

Dai C., Xue H.W. Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signaling // *EMBO J.* – 2010. – Vol. 29, No 11. – P. 1916-1927. DOI:10.1038/emboj.2010.75

Feng S., Martinez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J., Wang F., Chen L.Y., Yu L., Iglesias-Pedraz J.M., Kircher S., Schafer E., Fu X.D., Fan L.M., Deng X.W. Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins // *Nature*. – 2008. – Vol. 451, No. 7177. – P. 475-479. DOI: 10.1038/nature06448.

Fu X., Richards D.E., Ait-Ali T., Hynes L.W., Ougham H., Peng J., Harberd N.P. Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor // *Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14, No 12, – P. 3191-3200.

Itoh H., Shimada A., Ueguchi-Tanaka M., Kamiya N., Hasegawa Y., Ashikari M., Matsuoka M. Overexpression of a GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice // *Plant J.* – 2005. – Vol. 44, No. 4. – P. 669-679. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02562.x.

Gomi K., Sasaki A., Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice // *Plant J.* – 2004. – Vol. 37, No 4. – P. 626-634.

Dill A., Sun T.P. Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana // *Genetics*. – 2001. – Vol. 159. – P. 777-785.

Alvey L. and Harberd N.P. DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs // *Physiologia Plantarum*. – 2005. – Vol. 123. – P. 153-160. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2004.00412.x.

Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation // *Annu Rev Plant Biol.* – 2008. – Vol. 59. – P. 225-251. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804.

Gilroy S., Jones R.L. Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. Vol. 89. – P. 3591-3595.

Pearce S., Saville R., Vaughan S.P., Chandler P.M., Wilhelm E.P., Sparks C.A., Al-Kaff N., Korolev A., Boulton M.I., Phillips A.L., Hedden P., Nicholson P., Thomas S.G. Molecular Characterization of Rht-1 Dwarfing Genes in Hexaploid Wheat // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 157. – P.1820-1831.

Wu J., Kong X., Wan J., Liu X., Zhang X., Guo X., Zhou R., Zhao G., Jing R., Fu X., Jia J. Dominant and pleiotropic effects of a GAI gene in wheat results from lack of interaction between DELLA and GID1 // *Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 157. – P.2120-2130. DOI: 10.1104/pp.111.185272.

Chandler P.M., Harding C.A., Ashton A.R., Mulcair M.D., Dixon N.E., Mander L.N. Characterization of gibberellin receptor mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Mol Plant*. – 2008. – Vol. 1, No 2. – P. 285-94. DOI: 10.1093/mp/ssn002.

Lou X., Li X., Li A., Pu M., Shoab M., Liu D., Sun J., Zhang A., Yang W. Molecular Characterization of Three gibberellin-insensitive DWARF2 Homologous Genes in Common Wheat // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 11, № 6. – P.e0157642. DOI:10.1371/journal.pone.0157642.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, No. 5259. – P. 680-685.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.

References

Alvey L. and Harberd N.P. (2005) DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs. *Physiologia Plantarum*, vol. 123, pp. 153-160. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2004.00412.x

Boss P.K., Thomas M.R. (2002) Association of dwarfism and floral induction with a grape «green revolution» mutation. *Nature*, vol. 416, no 6883, pp. 847-850. DOI: 10.1038/416847a

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248-254.

Chandler P.M., Marion-Poll A., Ellis M., Gubler F. (2002) Mutants at the Slender1 locus of 'Himalaya' barley: molecular and physiological characterization. *Plant Physiol.*, vol. 129, no 1, pp. 181-190. DOI: 10.1104/pp.010917

Chandler P.M., Harding C.A., Ashton A.R., Mulcair M.D., Dixon N.E., Mander L.N. (2008) Characterization of gibberellin receptor mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Plant*, vol. 1, no 2, pp. 285-94. DOI: 10.1093/mp/ssn002. Epub 2008 Feb 11.

Cheng H., Qin L., Lee S., Fu X., Richards D.E., Cao D., Luo D., Harberd N.P., Peng J. (2004) Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development*, vol. 131, no 5, pp.1055-1064. DOI:10.1242/dev.00992

Dill A., Sun T.P. (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana. *Genetics*, vol. 159, pp. 777-785.

Dai C., Xue H.W. (2010) Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO J.*, vol. 29, no 11, pp. 1916-1927. DOI:10.1038/emboj.2010.75

Feng S., Martinez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J., Wang F., Chen L.Y., Yu L., Iglesias-Pedraz J.M., Kircher S., Schafer E., Fu X.D., Fan L.M., Deng X.W. (2008) Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature*, vol. 451, no 7177, pp. 475-479. DOI: 10.1038/nature06448

- Fu X., Richards D.E., Ait-Ali T., Hynes L.W., Ougham H., Peng J., Harberd N.P. (2002) Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *Plant Cell*, vol. 14, no 12, pp. 3191-3200.
- Gilroy S., Jones R.L. (1992) Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 89, pp. 3591-3595.
- Gomi K., Sasaki A., Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. (2004) GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J.*, vol. 37, no 4, pp. 626-634.
- Gubler, F., Chandler, P.M., White, R.G., Llewellyn, D.J., and Jacobsen, J.V. (2002) Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.*, vol. 129, pp. 191–200. DOI: 10.1104/pp.010918
- Ikeda A., Ueguchi-Tanaka M., Sonoda Y., Kitano H., Koshioka M., Futsuhara Y., Matsuoka M., Yamaguchi J. (2001) Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell*, vol. 13, no 5, pp. 999-1010.
- Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., Sato Y., Ashikari M., Matsuoka M. (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell*, vol. 14, no 1, pp. 57-70. DOI: 10.1105/tpc.010319.
- Itoh H., Shimada A., Ueguchi-Tanaka M., Kamiya N., Hasegawa Y., Ashikari M., Matsuoka M. (2005) Overexpression of a GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice. *Plant J.*, vol. 44, no 4, pp. 669-679. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02562.x
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, vol. 227, no 5259, pp. 680-685.
- Lou X., Li X., Li A., Pu M., Shoaib M., Liu D., Sun J., Zhang A., Yang W. (2011) Molecular Characterization of Three gibberellin-insensitive DWARF2 Homologous Genes in Common Wheat. *PLoS ONE*, vol. 11, no 6, pp.e0157642. DOI:10.1371/journal.pone.0157642.
- Pearce S., Saville R., Vaughan S.P., Chandler P.M., Wilhelm E.P., Sparks C.A., Al-Kaff N., Korolev A., Boulton M.I., Phillips A.L., Hedden P., Nicholson P., Thomas S.G. (2011) Molecular Characterization of Rht-1 Dwarfing Genes in Hexaploid Wheat. *Plant Physiology*, vol. 157, pp. 1820-1831.
- Peng J., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintham J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F., Sudhakar D., Christou P., Spape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. (1999) «Green Revolution» genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, vol. 400, no 6741, pp. 256-261. DOI: 10.1038/22307
- Phillips S. and Norton R. (2012) Global Wheat Production and Fertilizer Use. *Better Crops*, vol. 96, no 3, pp. 4-6.
- Silverstone A.L., Ciampaglio C.N., Sun T. (1998) The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell*, vol. 10, no 3, pp. 155-169. DOI: 10.1105/tpc.10.2.155
- Ueguchi-Tanaka M., Nakajima M., Motoyuki A., Matsuoka M. (2007) Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 58, no 1, pp. 183-198. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103830
- Wu J., Kong X., Wan J., Liu X., Zhang X., Guo X., Zhou R., Zhao G., Jing R., Fu X., Jia J. (2011) Dominant and pleiotropic effects of a GAI gene in wheat results from lack of interaction between DELLA and GID1. *Plant Physiol.*, vol. 157, pp. 2120-2130. DOI: 10.1104/pp.111.185272.
- Yamaguchi S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol.*, vol. 59, pp. 225-251. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804.