

УДК 577.216.3, 577.218

Р.М. Наргилова*, О.В. Карпова, А.М. Писаренко, Б.К.Искаков
Институт молекулярной биологии и биохимии имени М. А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан
*e-mail: rufina.nargilova@mail.ru

Трансляция *in vitro* синтетических мРНК *HvNHX3*, *AtDREB1A* и *AtDREB2A*

Целью работы являлась оптимизация реакции трансляции *in vitro* в бесклеточной системе зародышей пшеницы мРНК генов *HvNHX3*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A* и дальнейшая их диагностика с помощью [³²S]-метионина. В результате электрофореза SDS-ПААГ получены белковые продукты синтеза всех видов мРНК. Так же подобраны оптимальные условия для диагностики продукта трансляции мРНК *HvNHX3* с участием различных детергентов.

Ключевые слова: трансляция, транскрипция, *HvNHX3*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A*.

R.M. Nargilova, O.V. Karpova, A.M. Pissarenko, B.K. Isakov

Translation *in vitro* of synthetic *HvNHX3*, *AtDREB1A* and *AtDREB2A* mRNA

The task of this work is optimization of *in vitro* translation process of *HvNHX3*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A* mRNAs in cell free wheat system and further its diagnostic using [³²S]-methionine. Protein products were obtained as the result all kind mRNAs synthesis after SDS-PAAG electrophoresis. Also we determined optimal conditions for product diagnostic of mRNA *HvNHX3* translation using different detergents.

Keywords: Transcription, translation, трансляция, транскрипция, *HvNHX3*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A*.

Р.М. Наргилова, О.В. Карпова, А.М. Писаренко, Б.К.Искаков

HvNHX3, *ATDREB1A* және *ATDREB2A* синтетикалық мРНК-ның *in vitro* трансляциясы

Жұмыстың мақсаты бидай ұрығының клеткасыз жүйесінде *HvNHX3*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A* мРНК-ның *in vitro* трансляциясын оңтайландыру және кейінгі олардың [³²S] – метионин көмегімен диагностикасы болып табылды. SDS-ПААГ электрофорезінің нәтижесінде барлық мРНК түрлері синтезінің ақуызды өнімі алынған. Сонымен қатар *HvNHX3* мРНК-ның трансляциясы өнімінің түрлі детергенттердің қатысуымен диагностикасы үшін қолайлы шарттар табылған.

Түйін сөздер: Трансляция, транскрипция, *HvNHX3*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A*.

Среди искусственных систем биосинтеза белка важное место занимают бесклеточные системы. Бесклеточные системы создаются для моделирования биохимических процессов, происходящих в живом организме, и воспроизводят некоторые особенности жизнедеятельности клетки [1]. Бесклеточные системы дают возможность работать с широким спектром мРНК, лишенных основных регуляторных модификаций. Из множества прикладных задач *in vitro* система позволяет экспрессировать гены токсичных белков, включать модифицированные аминокислоты в процессе синтеза белков, вносить необходимые дополнительные компоненты, облегчающие диагностику продуктов синтеза, для изучения экспрессии генов мембранных и других труднорастворимых белков.

Устойчивость растений к почвенному засолению обеспечивается разнообразными

механизмами, как на уровне отдельных клеток, так и на уровне целого растения. В условиях солевого стресса, одним из защитных механизмов растений является удаление ионов Na⁺ из цитоплазмы в вакуоль. Белок *HvNHX3* является Na⁺/H⁺ - антипортером и относится к семейству белков *NHX* у растений. Внутриклеточные Na⁺/H⁺(*NHX*) - антипортеры имеют важное значение в поддержании клеточной pH и гомеостаза ионов Na⁺, K⁺ [2].

Одним из альтернативных подходов к разработке засухоустойчивых растений в генной инженерии является введения генов стресс-толерантности в геном растения, в том числе генов транскрипционных факторов. Транскрипционные факторы - это специфические белки, которые синтезируются в ответ на действие абиотического стресса, способные связываться с определенными ДНК-последовательностями в регуляторных

областях генов-мишеней, и приводящие к активации последующих генов. Одним из классов транскрипционных факторов, которые активируются при засухе или низких температурах, являются белки семейства *DREB* [3,4].

Материалы и методы

С помощью T7 РНК-полимеразы в ходе реакции транскрипции *in vitro* были синтезированы различные варианты мРНК (таблица 1). Транскрибированные РНК очищали и равные количества использовали в реакции трансляции.

Таблица 1 – Варианты мРНК, использованные в реакции транскрипции *in vitro*

№	Варианты мРНК
1	<i>NHX3-6Histaq - 3`TMV - noster</i>
2	<i>ΔDREB2A - 8Histaq - 3`TMV - noster</i>
3	<i>natDREB2A - 8Histaq - 3`TMV - noster</i>
4	<i>5`115x3 - natDREB2A - 8Histaq - 3`TMV - noster</i>
5	<i>5`Y - natDREB2A - 8Histaq - 3`TMV - noster</i>
6	<i>5`115x3 - ΔDREB2A - 8Histaq - 3`TMV - noster</i>
7	<i>5`Y - ΔDREB2A - 8Histaq - 3`TMV - noster</i>
8	<i>5`115x3 - DREB1A - 8Histaq - 3`TMV - noster</i>
9	<i>5`Y - DREB1A - 8Histaq - 3`TMV - noster</i>
10	<i>5`pl - DREB1A - 8Histaq - 3`TMV - noster</i>
11	<i>5`Ω - DREB1A - 8Histaq - 3`TMV - noster</i>
12	<i>5`Y - GUS - 8Histaq - 3`Y</i>

Для проведения реакции трансляции нами были использованы следующие компоненты: 20 мМ Трис-НСl рН 7,6; 100 мМ КCl; 2,5 мМ MgCl₂; 10 мМ креатинфосфат; 2,5 мкг креатинфосфокиназы; 1 мМ АТФ; 0,1 мМ ГТФ; 0,1 мМ спермин; 80 мкМ смеси аминокислот без метионина; 200 кБк [³⁵S]метионина; 0,3-0,5 о.е. A₂₈₀ цитоплазматического экстракта (S₂₃), 1-2 мкг мРНК. Смесь инкубировали в течение 1 часа при температуре +26°C. Далее в образцы добавляли 1х образцовый буфер с использованием денатурирующего агента β-меркаптоэтанола. Образцы для вариантов *AtDREB1A* и *AtDREB2A* прогревали 5 минут при 90°C, для варианта *NHX3* – 20 минут при 50°C. После этого смеси центрифугировали 5 минут при 16 000 об/мин. Электрофорез проводили в 12% SDS-содержащем

полиакриламидном геле. Гель высушивали для получения радиоавтографа.

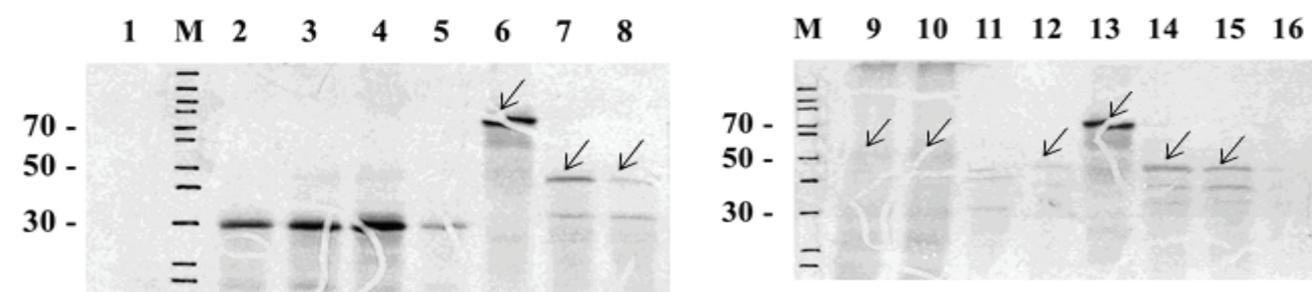
Результаты и их обсуждение

Была проведена реакция трансляции в бесклеточной системе пшеницы с использованием меченного [³²S] вариантов мРНК, содержащих последовательности генов *HvNHX3*, *AtDREB1A* и *AtDREB2A* с разными 5`-нетранслируемыми последовательностями (НТП) (таблица 1, рисунок 1), где 5`*pl* – нативная полилинкерная последовательность размером 17 нуклеотидов; 5`-Ω – полная последовательность 5`-НТП геномной РНК вируса табачной мозаики, 5`Y – полнодлинная последовательность 5`-НТП геномной РНК Y-вируса картофеля, 5`115x3 – синтетическая последовательность, несущая 3 повторяющихся 10-ти нуклеотидных участка, комплементарных к району 1115-1124 18S рРНК растений.

Результаты реакции трансляции показаны на рисунке 1. В качестве положительного контроля была взята мРНК с кодирующей последовательностью гена β-глюкуронидазы. *GUS*-белок идентифицируется на уровне 70-72 кДа (дорожки 6 и 13). Отрицательным контролем служила трансляционная смесь без добавления РНК (дорожки 1 и 16).

На рисунке 1 белок *AtDREB1A* виден на уровне 28-30 кДа (дорожки 2 – 5 (указаны стрелками) со следующими 5`-НТП: 5`115x3, 5`*pl*, 5`Y и 5`Ω, соответственно). На рисунке заметно, что присутствие варианта лидера 5`Y увеличивает выход белка по сравнению с другими 5`-НТП, что согласуется с ранее полученными нами результатами [5].

Для варианта *AtDREB2A* нами были получены два вида белковых продуктов, т.к. мы использовали два вида мРНК: (1) соответствовала нативной последовательности гена, (2) соответствовала последовательности с делецией размером в 30 аминокислотных остатков в центральном районе. Удаление этой области приводит к посттрансляционной модификации, необходимой для активации белка *DREB2A* [6]. Для делетированного варианта результат отмечен на рисунке 1а под номерами 7 (вариант лидера 5`115x3) и 8 (вариант 5`Y), размер синтезируемого белка ~ 40 - 42 кДа. Однако в вариантах с нативной формой *AtDREB2A* наблюдается неоднозначная картина.



а б
Дорожки 1, 16 – отрицательный контроль (без мРНК); 2–5 – соответственно мРНК № 8, 10, 9, 11 (*AtDREB1A*, смотри таблицу 1), 7, 8, 11, 12, 14, 15 – мРНК № 6, 7, 2 (*ADREB2A*) 3, 4, 5, (*natDREB2A*); 9 – 10 – мРНК №1 (*HvNHX3*); 6, 13 – мРНК №12 (*GUS*). Стрелками указаны продукты ожидаемых размеров

Рисунок 1 – Радиоавтограф продуктов трансляции *in vitro* в бесклеточной системе зародышей пшеницы

На рисунке 16 под номерами 14 и 15 стрелками обозначен белок ожидаемого размера (~ 50 кДа), но также появляется дополнительная полоса размером около 38-40 кДа. Одним из предположений для объяснения этого может быть следующее: компоненты бесклеточной системы, присутствующие в реакционной смеси, влияют на структуру продукта, изменяя подвижность его в геле. Под номерами 11 и 12 на рисунке 1 показаны результаты синтеза дельтированной и нативной формы белка *AtDREB2A* без 5'-НТП. В обоих случаях белок синтезируется в меньшем количестве, а во втором варианте опять присутствует вторая полоса.

На рисунке 16 (дорожки 9 и 10) видно, что большое количество продукта синтеза белка

HvNHX3 осталось на границе гелей и не вошло в разделяющий гель, а продукт ожидаемого размера на уровне ~ 55 кДа обнаруживается в следовых количествах. Это может происходить по причине того, что из-за большой гидрофобности белок может образовывать агрегаты с большой молекулярной массой, которые из-за размера не способны войти в разделяющий гель.

Мы попытались изменить условия подготовки образца перед электрофорезом. Для этого использовали восстанавливающий агент дитиотрейтол, а также неионные детергенты тиодизтанол, дигитонин и *n*-додецил- β -D-мальтозид, которые позволяют растворять мембранные белки. Результаты изображены на рисунке 2.

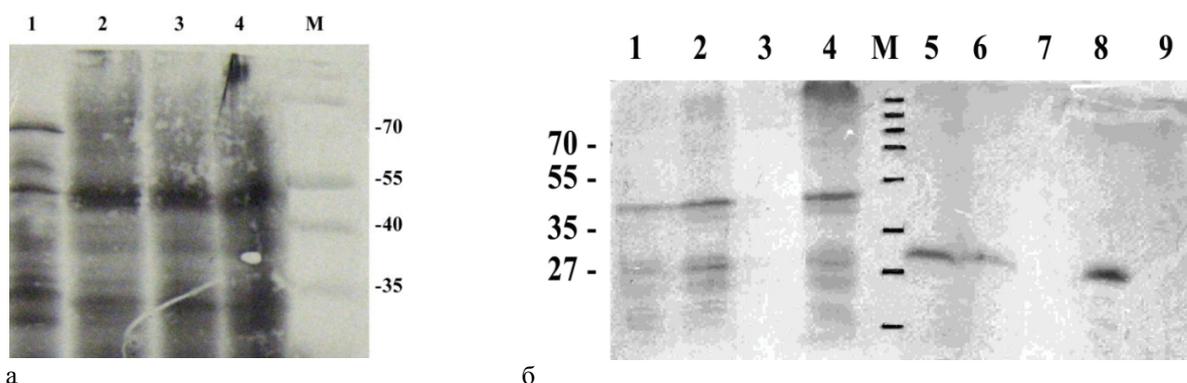


Рисунок 2 - Авторадиография продуктов трансляции в бесклеточной системе из зародышей пшеницы с использованием дитиотрейтола (а) и детергентов (б)

Готовили пробы трех вариантов: с добавлением β -меркаптоэтанола (дорожка 2 на рисунке 2а), с добавлением дитиотрейтола без предварительного осаждения этанолом (дорожка 3) и с осаждением спиртом (дорожка 4). Количество белка в геле увеличилось, но на рисунке заметно двоение полос, что, предположительно, свидетельствует, возможно, о неполном синтезе белка в системе или присутствием двух форм белка.

Исходя из этих результатов, было решено подобрать оптимальные условия для синтеза белка с использованием различных неионных детергентов, способных растворять или существенно изменять растворимость биологических мембран. На рисунке 3 показаны результаты использования 1%-ного тиодизэтанола (дорожка 1 на рисунке 2б), 1%-ного дигитонина (дорожка 2) и 0,5%-ного п-додецил- β -D-мальтозида (дорожка 3).

Параллельно проводили трансляцию мРНК варианта *AtDREB1A* с добавлением этих же детергентов, изображенных на рисунке 2б в той же последовательности под номерами 5, 6 и 7. Пробы без добавления детергентов под номерами 4 (вариант белка *HvNHX3*) и 8 (*AtDREB1A*). Анализируя данный рисунок, можно сказать, что мальтозид полностью ингибирует реакцию трансляции, так как отсутствуют даже следовые количества белка. В случае с дигитонином и тиодизэтанолом синтез белка уменьшается, по сравнению с вариантом без детергента, однако видно, что белок весь вошел в разделяющий гель и не остался на границе. Согласно последнему эксперименту, детергенты способны менять гидрофобность белка *NHX3*, и это обстоятельство в дальнейшем может использоваться при изучении свойств, выделении этого белка и его очистке.

Литература

- 1 Патрушев Л. И. Экспрессия генов страница. – М.: Наука, 2000. – 219с.
- 2 Bassil T. Antiporters *NHX1* and *NHX2* Control Vacuolar pH and K⁺ Homeostasis to Regulate Growth, Flower Development, and Reproduction The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ // The Plant Cell. – 2011. - Vol. 23. – P. 3482-3497.
- 3 Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 1998. - Vol.10. – P. 1391–1406
- 4 Abdelaty S. Plant AP2/ERF transcription factors //Genetika. – 2003. - Vol. 35, №1. – P. 37-50.
- 5 Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A.V., Polimbetova N.S., Hohn T., Iskakov B.K. ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intercistronic region of mRNAs // Nucleic Acids Research. - 2004. - V. 32. - No.1. – P. 239-247.
- 6 Sakuma Y. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, *DREB2A*, involved in drought-responsive gene expression // Plant Cell. – 2006. - №18. – P. 1292–1309.