

УДК 581.1

doi: 10.17223/19988591/18/17

М.В. Ефимова^{1,2}, А.К. Кравцов², В.В. Кузнецов²

¹Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск, Россия)

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва, Россия)

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИИ ПЛАСТИДНЫХ ГЕНОВ *Hordeum vulgare* В ТЕМНОТЕ

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ
(гранты № 11-04-90806-моб_ст, 12-04-90716-моб_ст).

С помощью метода *gus-on* транскрипции изучена транскрипция 16 пластидных генов в первых этиолированных листьях ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Анализируемые гены относятся к функционально-различным группам генов пластома. Прежде всего это гены, продукты которых выполняют первостепенную роль для реализации фотосинтеза: гены фотосистем I, II, ген большой субъединицы РБФК, АТФ синтетазного комплекса – *atp* – и субъединица F НАДФН пластохиноноксидоредуктазы – *ndhF*. Среди генов «домашнего хозяйства» была изучена транскрипция гена, кодирующего β субъединицу РНК-полимеразы бактериального типа (*groB*), гены 16S и 23S рибосомной РНК (*rrn16* и *rrn23*); гены тРНК-Глу и тРНК-Тир (*trnE-Y*). В результате проведенных исследований нами показана дифференциальная транскрипция пластидных генов.

Ключевые слова: ячмень; пластидные гены; *gus-on* транскрипция; этиоляция.

Введение

Для реализации основной энергетической функции света растениям необходимо сформировать фотосинтетический аппарат. Особое внимание привлекает процесс регуляции транскрипции в связи с тем, что транскрипция является первым этапом экспрессии генов и от нее зависит не только количество индивидуальных мРНК, но и накопление белка, что прямо влияет на превращение этиопластов в хлоропласты и переход этиолированных растений к автотрофному питанию. Среди многочисленных методов исследования, позволяющих оценивать относительное содержание индивидуальных РНК в клетке, можно выделить метод микрочипов, ПЦР в реальном времени, нозерн- и дот-гибридизации. Единственный метод, демонстрирующий вклад процесса транскрипции в регуляцию содержания мРНК и позволяющий определить скорость транскрипции генов, – метод *gus-on* транскрипции [1]. Данный метод основан на способности изолированных органелл в течение непродолжительного времени осуществлять транскрипцию генов. В нашем исследовании с помощью метода *gus-on* транскрипции оценивалась транскрипция пластидных генов проростков ячменя.

Материалы и методики исследования

Для анализа экспрессии пластидного генома ячменя на уровне транскрипции начальным этапом является выделение хлоропластов. При выделении хлоропластов использовали ступенчатый градиент перкола (40 и 70%), который позволяет очистить хлоропласты от ядер и митохондрий и отделить интактные хлоропласты от разрушенных. Для дальнейшей работы брали 5×10^7 хлоропластов для каждого варианта.

Подсчет количества хлоропластов производили на микроскопе Micros MC 100 (Австрия) в камере Розенталя–Фукса. Синтез меченых транскриптов в хлоропластном лизате, ДНК-РНК гибридизацию и экспозицию нейлоновой мембраны с рентгеновской пленкой проводили согласно методике проведения *gun-on* анализа [1–3].

После гибридизации радиоактивные сигналы отсканировали и оцифровывали, используя Phosphorimager Typhoon Trio (сканер Typhoon TRIO+ Variable Mode Imager с пакетом программ Typhoon Scanner Control) и ImagerQuant TL Control Centre («GE Healthcare», США).

Результаты исследования и обсуждение

Нами проанализирована транскрипция 16 пластидных генов ячменя, относящихся к функционально-различным группам генов пластома. Прежде всего, это гены, продукты которых выполняют первостепенную роль для реализации фотосинтеза: гены фотосистемы I – *psa* (*psaA* и *psaB*), фотосистемы II – *psb* (*psbA*, *psbD* и *psbK*), ген большой субъединицы РБФК (*rbcL*), АТФ синтетазного комплекса – *atp* (*atpB*) и субъединица F НАДФН пластохиноноксидоредуктазы – *ndhF*.

Среди генов «домашнего хозяйства» была изучена транскрипция гена, кодирующего β субъединицу РНК-полимеразы бактериального типа (*rpoB*), гены 16S и 23S рибосомной РНК (*rrn16* и *rrn23*); гены тРНК-Глу и тРНК-Тир (*trnE-Y*) и др. Подробное описание анализируемых генов приведено в статьях Kravtsov et al., Zubo et al. и Bork [4–6].

Радиоавтографы типичного опыта, полученные в ходе *gun-on* эксперимента с пластидами из первых листьев этиолированного ячменя, и интенсивность транскрипции, выраженная в условных единицах, показаны на рис. 1, 2.

Радиоавтограмма результатов *gun-on* транскрипции позволяет выделить три условные группы генов с высокой, средней и низкой транскрипционной активностью. Так, к группе генам с высокой транскрипционной активностью можно отнести гены, продукты которых выполняют не только первостепенную роль для реализации процесса фотосинтеза и кодируют белки фотосистемы II (*psbA* и *psbD*), большую субъединицу РБФК (*rbcL*) и АТФ-синтазу (*atpB*), но и гены «домашнего хозяйства, кодирующие рибосомный белок (*rrn16*) и транспортную РНК (*trnE/trnY*).

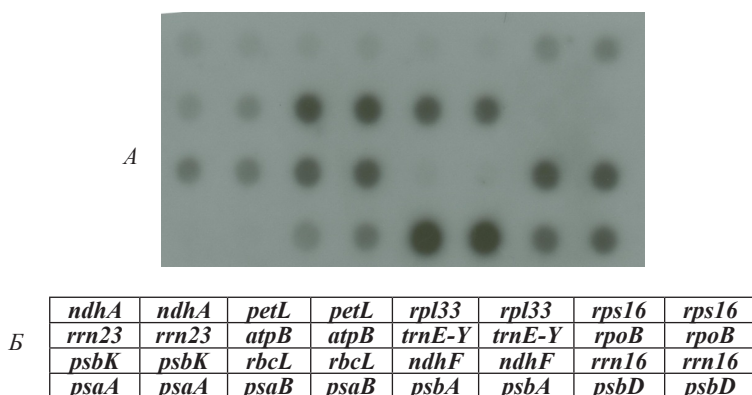


Рис. 1. Радиограмма результатов gup-on транскрипции: А – радиограмма результатов gup-on транскрипции; Б – схема нанесения на мембрану ДНК-зондов исследованных генов

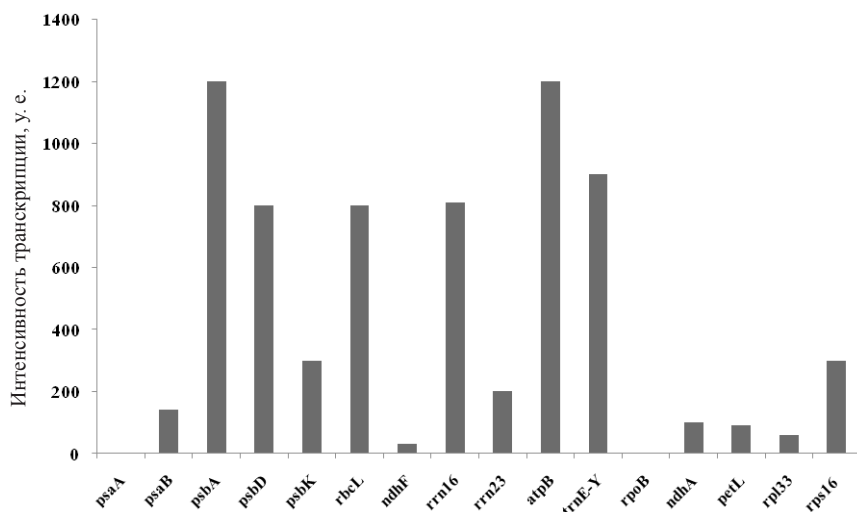


Рис. 2. Интенсивность транскрипции пластидных генов ячменя

В группу со средней транскрипционной активностью можно включить ген фотосистемы I (*psaB*), ген *psbK*, кодирующий К-субъединицу (3,9 кДа) фотосистемы II, и гены рибосомных белков (*rrn23* и *rps16*). Среди генов, проявляющих низкую транскрипционную активность, можно выделить гены, кодирующие F (*ndhF*) и A (*ndhA*) субъединицы НАДН-пластохиноноксидоредуктазы, ген L субъединицы цитохрома b_6f (*petL*) и ген рибосомного белка L33 (*rpl33*) (рис. 2). Транскрипционная активность двух генов этиолированных листьев ячменя – *psaA* и *rpoB* – в темноте не проявлялась.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований на этиолированных проростках ячменя нами показана дифференциальная транскрипция пластидных генов. Из 16 анализируемых генов наибольшая интенсивность транскрипции отмечена для генов, кодирующих белки фотосистемы II (*psbA*, *psbD* и *psbK*), большую субъединицу РБФК (*rbcL*), АТФ-синтазы (*atpB*), рибосомные белки (*rrn16*, *rrn23* и *rps16*) и гены транспортной РНК (*trnE/trnY*).

Литература

1. Зубо Я.О., Кузнецов В.В. Применение метода run-on транскрипции для изучения регуляции экспрессии пластидного генома // Физиология растений. 2008. Т. 55, № 1. С. 114–122.
2. Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К. и др. Особенности экспрессии пластидного генома и развития растений *Arabidopsis thaliana* с нарушенным синтезом брассиностероидов // Физиология растений. 2012. Т. 59, № 1. С. 32–39.
3. Зубо Я.О., Ямбуренко М.В., Кравцов А.К. и др. Отделенные от растений листья ячменя как экспериментальная модель для изучения регуляции цитокинином транскрипции пластидных генов // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 609–618.
4. Kravtsov A.K., Zubo Y.O., Yamburenko M.V. et al. Cytokinin and abscisic acid control plastid gene transcription during barley seedling de-etiolation // Plant Growth Regulation. 2011. Vol. 64. P. 173–183.
5. Zubo Y.O., Yamburenko M.V., Kusnetsov V.V., Börner T. Methyl jasmonate, gibberellic acid, and auxin affect transcription and transcript accumulation of chloroplast genes in barley // J. Plant Physiology. 2011. Vol. 168, iss. 12. P. 1335–1344.
6. Bock R. Structure, function, and inheritance of plastid genomes // Topics in Current Genetics. Vol. 19. 2007. R. Bock (Ed.): Cell and Molecular Biology of Plastids. P. 29–65.

Поступила в редакцию 21.07.2011 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2012. № 2 (18). P. 166–170

doi: 10.17223/19988591/18/17

Marina V. Efimova^{1,2}, Alexander K. Kravtsov², Viktor V. Kusnetsov²

¹Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia

²Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

THE ANALYSES OF PLASTID GENE TRANSCRIPTION *Hordeum vulgare* IN DARKNESS

Experiments were performed with the leaves of barley plants (*Hordeum vulgare* L.). The seeds were germinated in soil in the climate-controlled chamber in darkness at 20–22°C. First true leaves detached from 6-day-old seedlings were used. The age was counted from the moment of seedling emergence above the soil surface. Plastid isolation and run-on transcription in plastid lysates were performed as described Zubo and Kusnetsov, 2008. Etioplasts were isolated from etiolated plants under dark green light and purified in the discontinuous gradient of Percoll (40 and 70%). In vitro transcription was run for 10 min at 25°C in the lysates of 5×10^7 chloroplasts

in buffer. Fragments of the tested genes (1 µg) were loaded on the nylon membrane Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biothech, England) in two replications. After their hybridization with ³²P-labeled RNAs produced in the reaction of run-on transcription *in vitro*, radioactive signals were scanned using Phosphorimager Typhoon Trio⁺ (GE Healthcare, USA).

The rate transcription of 16 chloroplast gene was analyzed. First of all, genes, product which plays supreme role in photosynthesis realization – photosystem I – *psa* (*psaA* and *psaB*), photosystem II – *psb* (*psbA*, *psbD* and *psbK*), gene of large subunit of Rubisco (*rbcL*), ATP synthase complex – *atp* (*atpB*) and F subunit NADPH of plastochinon oxidoreductase – *ndhF*. Among «housekeeping» genes the transcription of gene, which code β subunit of plastid bacterial-type RNA polymerase (*rpoB*), 16S and 23S rRNA genes (*rrn16* and *rrn23*), also tRNA genes – Gly and Tir (*trnE-Y*) was investigated.

The results obtained showed that the rate of chloroplast gene transcription in the first barley leaves was significantly dispersed. The highest transcription was marked to genes, which coded protein of photosystem II (*psbA*, *psbB* and *psbD*), large subunit of Rubisco (*rbcL*), ATP-synthase (*atpB*), ribosomal proteins (*rrn16*, *rrn23* and *rps16*), also tRNA genes (*trnE/trnY*).

Key words: barley; plastid gene; run-on transcription method; etiolation.

Received July 21, 2011