

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 581.1

**АНАЛИЗ ИНТРОН-СОДЕРЖАЩИХ ПРЕ-мРНК И СПЛАЙСИРОВАННЫХ  
мРНК В ХЛОРОПЛАСТАХ КУКУРУЗЫ ПОСРЕДСТВОМ ОТ-ПЦР**

© 2013 г. Е. А. Лысенко\*, А. А. Клаус, В. В. Кузнецов

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, 127276*

Поступила в редакцию 13.08.2012 г.

Принята к печати 11.09.2012 г.

Для анализа сплайсинга хлоропластных РНК обычно используют дорогостоящие и трудоемкие методы – такие, как нозерн-блот гибридизация, защита от РНКаз или удлинение праймеров. Применение более доступного метода ОТ-ПЦР может приводить к не полному выявлению нессплайсированных пре-РНК. Мы изучили, какие факторы этого метода могут способствовать наблюдаемому снижению доли интрон-содержащих транскриптов относительно зрелых РНК на примере пяти белок-кодирующих генов хлоропластов кукурузы. Оказалось, что для адекватного выявления доли нессплайсированных форм РНК необходимо учитывать способы инактивации ДНКазы, температуру синтеза кДНК и качество используемой ДНК-полимеразы. В случае одного из генов наблюдали уменьшение доли интрон-содержащих транскриптов по мере увеличения числа циклов ПЦР. Показано, что после ПЦР нити ампликонов, содержащие и не содержащие последовательность интрона, могут образовывать гетеродуплексы. Предложена простая и эффективная методика анализа как сплайсированных мРНК, так и интрон-содержащих пре-мРНК в хлоропластах.

**Ключевые слова:** хлоропласты, РНК, сплайсинг, ОТ-ПЦР, обратные транскриптазы, ДНК-полимеразы, кукуруза.

THE STUDY OF INTRON CONTAINING PRE-mRNA AND SPLICED mRNA IN MAIZE CHLOROPLASTS WITH THE USE OF RT-PCR, by E. A. Lysenko\*, A. A. Klaus, V. V. Kusnetsov (Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia, \*e-mail: genlysenko@mail.ru). The study of chloroplast RNA splicing is usually performed by such complicated methods as Northern blot hybridization, RNase protection or primer extension. An application of simpler RT-PCR technique may lead to underestimation of unspliced pre-mRNA. We used five protein coding genes from maize plastome to analyze factors that can reduce a pool of intron containing transcripts as compared to a mature RNA. We revealed that a mode of DNase inactivation, a temperature of cDNA synthesis, and a type of DNA polymerase used are important for the proper detection of unspliced RNA level. The increase in a number of PCR cycles was accompanied with a concomitant decrease in the proportion of unspliced RNA for a one gene only. We demonstrated that after PCR intron containing and intron free strands of amplicons are able to form heteroduplexes. The information obtained let us to introduce the simple and effective method for the investigation of a chloroplast spliced mRNA and unspliced pre-mRNA.

**Keywords:** chloroplasts, RNA, splicing, RT-PCR, reverse transcriptases and DNA polymerases, maize.

DOI: 10.7868/S0026898413010072

Многие гены про- и эукариотических организмов содержат некодирующие участки – интроны, которые можно подразделить на четыре основные группы: интроны группы I и группы II, сплайсеосомные интроны эукариот и особый тип интронов архей и эукариотических тРНК [1]. Предполагают, что интроны группы II являются предками сплайсеосомных интронов [2]. В эукариотических клетках можно найти интроны всех

основных типов. Энергетические органеллы – митохондрии и пластиды – сохранили остатки геномов своих бактериальных предков и многие особенности организации генетического материала. В пластомах современных растений имеется около двух десятков интронов, один из которых принадлежит к группе I (*trnL*), остальные – к группе II [3]. Эти интроны находятся в генах, кодирующих пластидные белки и тРНК. В пласто-

Принятые сокращения: ОТ-ПЦР – ПЦР с кДНК (после обратной транскрипции).

\* Эл. почта: genlysenko@mail.ru

мах водорослей вставки интронов найдены и в генах рРНК [4].

В процессе созревания РНК интроны удаляются посредством механизма сплайсинга. У растений обнаружено более десятка белков, участвующих в сплайсинге пластидных интронов [3]. Нокаут-мутанты по многим из этих факторов сплайсинга нежизнеспособны, так как не могут длительное время поддерживать эффективное функционирование фотосинтетического аппарата. Такие мутанты изучены в основном у кукурузы – растения с большой зерновкой, способной обеспечить гетеротрофный рост проростка до двух недель.

Для анализа сплайсинга РНК в хлоропластах обычно используют такие методы, как нозерн-блот-гибридизация, защита от РНКаз (RNase protection) или удлинение праймеров (primer extension) [5–8]. Не исключено, что сложность этих методов ограничивает их применение для решения многих исследовательских задач. Так, до сих пор крайне мало известно о том, как изменяется эффективность сплайсинга в хлоропластах в ходе онтогенеза, при различных стрессах, у разных организмов. Нам известны только две работы, в которых для анализа сплайсинга пластидных РНК применяли относительно простой метод ОТ-ПЦР [6, 9]. Мы провели анализ сплайсинга мРНК *большого числа генов* в хлоропластах на базе этого метода.

Полученные нами предварительные данные указывали на то, что в хлоропластах кукурузы несплайсированных пре-мРНК нет или они имеются в следовых количествах. Анализ литературы показал, что, если те же самые хлоропластные мРНК кукурузы изучать при помощи других методов, то доля несплайсированных пре-мРНК значительна. Это показано в случае таких генов как *petB*, *petD* [5] и *atpF* [7]. Отметим, что у растений ячменя дикого типа несплайсированные пре-мРНК *rpl2* регистрируются при анализе методом защиты от РНКаз и не заметны, если использовали метод ОТ-ПЦР [6]. Вероятно, применение метода ОТ-ПЦР чревато опасностью недооценки доли несплайсированных РНК, что может приводить к неверным представлениям о соотношении несплайсированных и сплайсированных РНК и к неверной оценке эффективности процесса сплайсинга. Тем не менее, ранее при использовании метода ОТ-ПЦР обнаружили заметные количества несплайсированных пре-мРНК гена *rps16* в хлоропластах риса и сои [9]. Поэтому можно надеяться, что присущие этому подходу недостатки можно устранить. Нами поставлена задача изучить, какие факторы препятствуют выявлению несплайсированных молекул хлоропластных пре-мРНК, и предложить методику корректного выявления сплайсированных и интрон-содержащих

форм хлоропластных РНК, на примере пяти генов пластома кукурузы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Объект исследования** – растения кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Лучистая – выращивали 9 дней при 25°C, интенсивности освещения 200 мкмоль фотонов на м<sup>2</sup>/с с фотопериодом 16 ч свет/8 ч темнота, при постоянном аэрировании на модифицированной среде Хогланда следующего состава: 2 мМ буфер MES, pH 6.5, 3 мМ KNO<sub>3</sub>, 2 мМ Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 мМ NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 мМ FeSO<sub>4</sub>, 0.5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 25 мкМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 2 мкМ MnSO<sub>4</sub>, 1 мкМ KCl, 0.1 мкМ CuSO<sub>4</sub>, 0.1 мкМ (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.

**Выделение хлоропластов.** Все процедуры проводили при +4°C и слабом освещении. Листья (10–15 г) гомогенизировали в 60 мл буфера А (50 мМ буфер Трис-НCl, pH 8.0, 0.4 М сорбитол, 15 мМ NaCl, 2 мМ EDTA и 5 мМ β-меркаптоэтанол). Гомогенат фильтровали через один слой марли и два слоя мираклоза (“Calbiochem-Behring”, США) и центрифугировали на центрифуге К-23 в течение 1 мин при 3000 об/мин (1400 g на дне пробирки). Органельный осадок мягко ресуспендировали в 15 мл буфера А и фракционировали на ступенчатом (40/70%) градиенте Перкола (“GE Healthcare”, США) на центрифуге К-23 в течение 10 мин при 5500 об/мин (4000 g на уровне фракционирующего слоя). Интактные хлоропласты собирали на границе слоев и отмывали от Перкола, добавляя буфер А до 1.5 мл и центрифугуя 1 мин при 3800 об/мин (здесь и далее центрифуга Heraeus Biofuge fresco, +4°C). Супернатант аккуратно удаляли дозатором.

**ДНК** выделяли из изолированных хлоропластов по описанному методу [10] с небольшими модификациями.

**РНК** выделяли, следуя опубликованному протоколу [11], модифицированному согласно рекомендациям, изложенным на сайте molbiol.edu.ru, и на основе собственного опыта авторов. Осадок хлоропластов (на льду) растворяли в 5–10 объемах буфера Б (20 мМ буфер Трис-НCl, pH 7.0, 4 М гуанидинтиоцианат, 20 мМ EDTA, 0.7% лаурилсаркозин, 100 мМ β-меркаптоэтанол), добавляли равный объем смеси кислого фенола с хороформом (1 : 1), перемешивали 1 мин на вортексе и центрифугировали 3 мин при 13000 об/мин. Водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли 0.1 объем 3 М ацетат Na, pH 6.0, и 0.8 объема изопропанола и выдерживали 1 ч при –20°C. Центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин, осадок промывали 75%-ным этанолом и центрифугировали 2 мин при 13000 об/мин. На льду тщательно удаляли остатки этанола и растворяли оса-

## Размеры ампликонов (п.н.)

Гены	Аmplифицируемый регион			ПЦР-продукты	
	5'-экзон	интрон	3'-экзон	малый	большой
<i>atpF</i>	46	831	332	378	1209
<i>ndhA</i>	383	1023	43	426	1449
<i>petD</i>	18*	744	428	446	1190
<i>ycf3(-2)</i>	181	731	128	309	1040
<i>rps12-3'</i>	193	540	103*	296	836

\* – Вместе с 5'- или 3'-нетранслируемой областью. Большие по размеру ПЦР-продукты образуются с пластидной ДНК и с кДНК, синтезированной на пре-мРНК, малые – с кДНК, синтезированной на мРНК. В генах *atpF*, *ndhA* и *petD* ампликоны охватывают их единственные интроны между экзонами 1 и 2, в гене *ycf3* – второй интрон между экзонами 2 и 3, в гене *rps12-3'* – единственный интрон между экзонами 2 и 3 (экзон 1 – *rps12-5'* – расположен отдельно, транскрибируется независимо и присоединяется посредством механизма транс-сплайсинга [8]).

док в малом объеме деионизированной воды до концентрации 2–6 мкг/мкл.

Остатки ДНК удаляли, обрабатывая ДНКазой I при 37°C 30–60 мин. На 10 мкл реакционной смеси брали 1 е.а. ДНКазы I (“Fermentas”, Литва), 10 е.а. ингибитора РНКаз RiboLock (“Fermentas”) и 1 мкг хлоропластной РНК. По окончании реакции ДНКазу I инактивировали одним из трех способов: 1) прогревали в течение 10 мин при +70°C; 2) прогревали в течение 10 мин при +70°C, предварительно добавив к 10 мкл реакционной смеси 2 мкл 25 мМ ЭДТА; 3) увеличивали объем, добавляя воду, и смешивали с равным объемом смеси фенол-хлороформ (1 : 1) с последующим переосаждением, как при выделении РНК. При переосаждении теряется около 15% РНК.

**Синтез кДНК и ПЦР.** Для синтеза первой нити кДНК использовали обратные транскриптазы RevertAid, RevertAid Premium (“Fermentas”) и ThermoScript (“Invitrogen”, США). В качестве олигонуклеотида для синтеза кДНК использовали ген-специфичный антисмысловый (AS) праймер (см. ниже), и для каждого гена синтез осуществляли отдельно. На 10 мкл реакционной смеси брали 0.5 мкл ревертазы, 1 мкл 10 мМ dNTP (“Fermentas”), 10 е.а. ингибитора РНКаз RiboLock (“Fermentas”), 1 мкл праймера (35–50 пмоль) и 2 мкл препарата РНК после обработки ДНКазой I (см. выше). Синтез проводили 40–50 мин при температуре 42°C (в случае RevertAid) или 50°C (в случае RevertAid Premium и ThermoScript). Если синтез проводили при более высокой температуре (55–65°C), то это отдельно оговаривается в тексте и в подписях к рисункам. После завершения реакции добавляли 10 мкл деионизированной

воды и проводили термоинактивацию ферментов по рекомендациям производителей.

Для ПЦР использовали следующие ДНК-полимеразы: Taq-ДНК-полимераза (“СибЭнзим”, Россия), DreamTaq (“Fermentas”) и Encyclo (“Евроген”, Россия). На 20 мкл реакционной смеси брали 0.25 мкл ДНК-полимеразы, 2 мкл 2 мМ dNTP (“Fermentas”), по 0.5 мкл (17–25 пмоль) праймеров (“Литех”, Россия) и 2 мкл препарата кДНК. Во всех реакциях температура на стадии элонгации 72°C, длительность – 90 с. Последовательности праймеров (5' → 3'): *atpFi-S* TCTAAGCTAGTGGT-TGGTGT, *atpFi-AS*-CAACTATTCAGAGTTCCTA-GAG; *ndhA-S* CGATACAACAACGTATTGGTCT, *ndhA-AS* ACTGTGCTTCAACTATATCAAC; *petD-S* AAGGCGGATTATGGGAGT, *petD-AS*-CAATAC-STAACCAAAGAGCTAC; *rps12-S* GTTGCCAGAG-TACGATTAAC, *rps12-AS* TACCTCGACGTGACAT-GA; *ycf3-S2* TTATGAAGCTACGCGACTAGA, *ycf3-AS*-AACCAGTTCTGTGCTTCAATA.

В первичной методике термоинактивацию ДНКазы I проводили без ЭДТА, использовали ревертазы RevertAid, Taq ДНК-полимеразы “СибЭнзим” в 40 циклах ПЦР. Если не оговорено дополнительно, то подразумевается этот вариант методики.

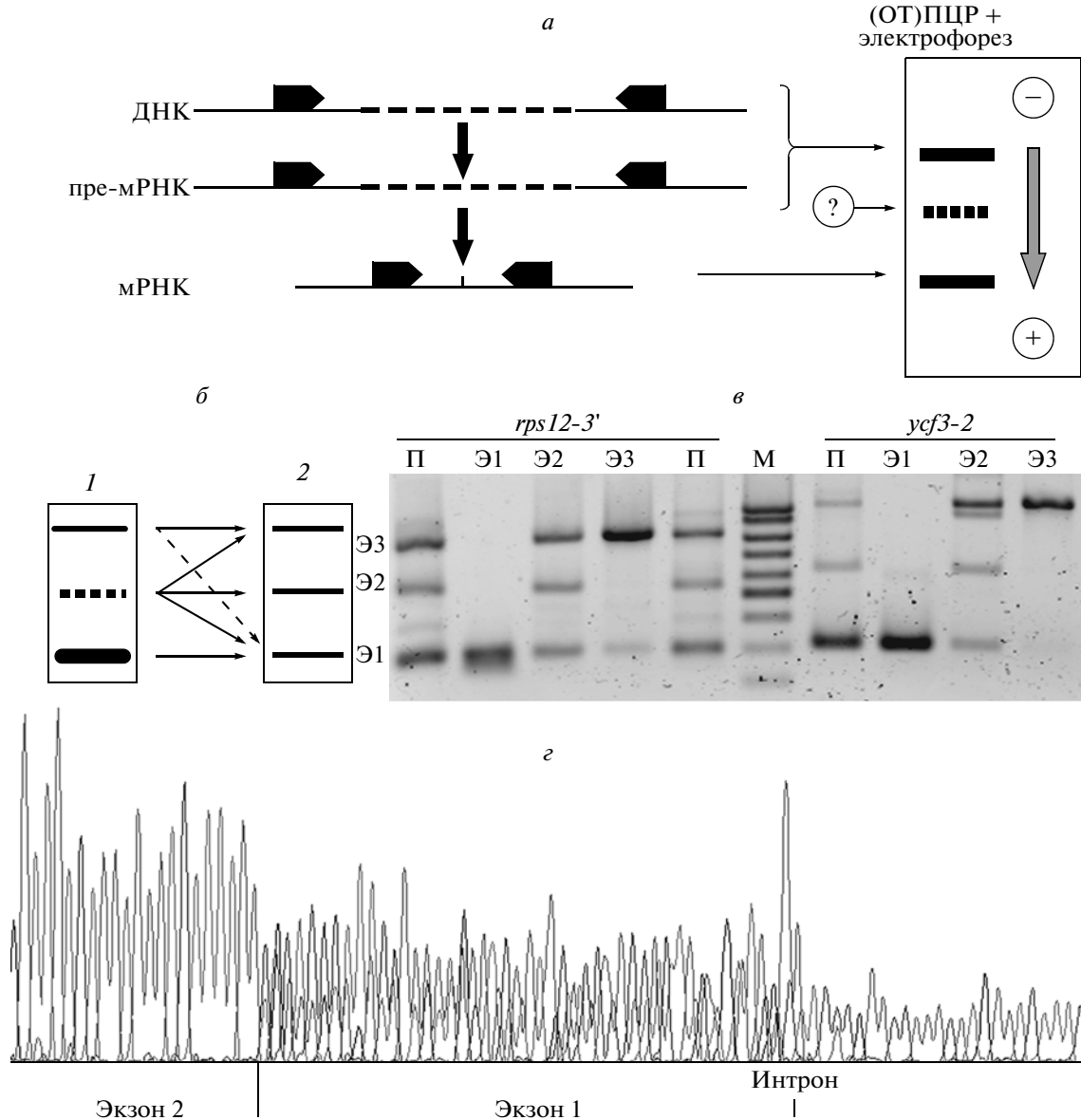
Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов проводили в буфере TAE (40 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 20 мМ ацетат Na, 1 мМ ЭДТА) в 1.5%-ном агарозном геле. Использовали ДНК-маркеры “100 bp” или “1kb” (“СибЭнзим”). Гели окрашивали бромистым этидием и регистрировали при помощи сканера Typhoon Trio+ (“GE Healthcare”).

**Секвенирование ПЦР-продуктов.** После завершения ПЦР содержимое пробирок подвергали электрофорезу, полосы вырезали из геля и элюировали при помощи набора “DNA extraction kit” (“Fermentas”), следуя рекомендациям производителя. Секвенирование образцов осуществляли в компании “Синтол” (Москва). Результаты анализировали при помощи программы Sequence Scanner v1.0 (“Applied Biosystems”, США). Все специфичные ПЦР-продукты были секвенированы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## Общая характеристика спектров ПЦР-продуктов

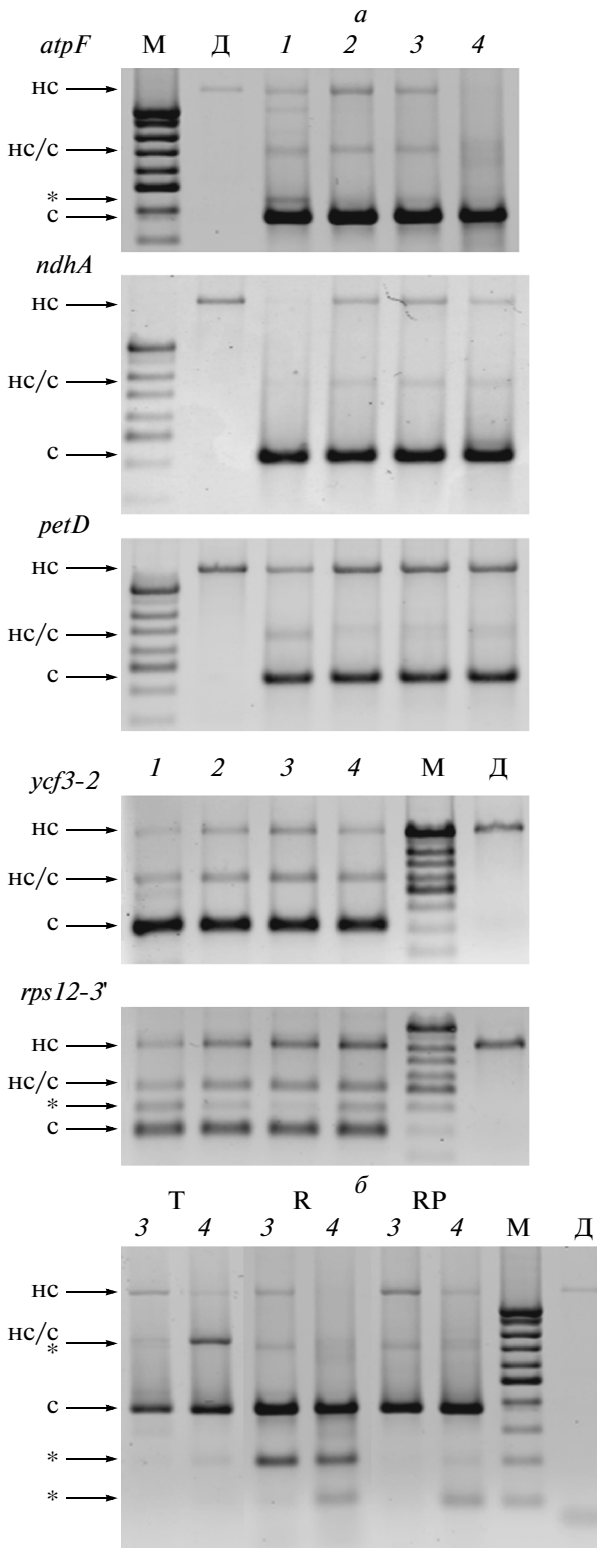
Конструировали пары праймеров, комплементарные к участкам экзонов по обе стороны от интрона (рис. 1а) так, что ПЦР-продукты с пластидной ДНК и с нессплайсированных пре-мРНК включали область интрона и имели размер в пределах 830–1450 п.н., а амплифицированные фрагменты сплайсированных мРНК – 300–450 п.н. (таблица). Однако, при разделении продуктов ОТ-ПЦР в геле, кроме двух ожидаемых полос, на-



**Рис. 1.** Схема конструирования праймеров для реакции ОТ-ПЦР и общая характеристика спектра продуктов амплификации (полос) при электрофорезе. *a* – Схема расположения пары праймеров относительно интрона и ожидаемая картина после электрофоретического разделения продуктов ПЦР. Пунктирной линией обозначен интрон. *б* – Схема трансформации исходных полос в геле (*1*) при повторном электрофорезе (*2*). Пояснение в тексте и далее. *в* – Исходные продукты амплификации кДНК (П) разделяли путем электрофореза, вырезали из геля и каждую элюированную полосу (Э1, Э2, Э3 – нумерация в порядке уменьшения подвижности в геле) подвергали повторному электрофорезу. Э1, Э2 и Э3 брали в разных количествах, чтобы выровнять относительную интенсивность полос. Маркер “100 bp” (М). *г* – Фрагмент результатов секвенирования полосы с промежуточной подвижностью (Э2) мРНК *atpF*. Зона пиков слева соответствует экзону 2. В середине – зона двойных пиков, в которой высокие пики соответствуют экзону 1 (самый высокий пик в конце этой зоны соответствует нуклеотиду А, добавляемому Taq-ДНК-полимеразой нематрично), а низкие – интрону. В правой зоне продолжается последовательность интрона.

блюдали третью полосу с промежуточной подвижностью. После электрофореза ПЦР-продукты вырезали из геля, элюировали и содержимое каждой полосы подвергали повторному электрофорезу. Оказалось, что низкомолекулярная и высокомолекулярная полосы при повторном элек-

трофорезе мигрируют так же, как и при первичном электрофорезе, хотя верхняя полоса иногда содержит минорную примесь коротких ампликонов. Промежуточная же полоса после элюции и повторного электрофореза снова распадается на три исходных полосы (рис. 1*б, в*). Логично было



предположить, что промежуточная полоса представляет собой гетеродуплекс, состоящий из короткой (сплайсированная форма) и длинной (содержащей интрон) нитей.

**Рис. 2.** Влияние различных способов инактивации ДНКазы I на относительный выход высокомолекулярных ПЦР-продуктов. **а** – Влияние способов инактивации ДНКазы I на примере пяти генов. 1 – Двукратный прогрев препарата хлоропластной РНК (для инактивации ДНКазы I – 10 мин при +70°C и для денатурации вторичных структур в РНК – непосредственно перед синтезом кДНК 10 мин при +70°C) без добавления ЭДТА. 2 – Так же, но предварительно добавляется ЭДТА. 3 – Однократный прогрев РНК (обработка ДНКазой I непосредственно перед синтезом кДНК, нагревание 10 мин при +70°C одновременно для инактивации ДНКазы I и денатурации вторичных структур в РНК перед синтезом кДНК). ЭДТА добавлена предварительно. 4 – Депротенинизация смесью фенол-хлороформ с последующим переосаждением, без прогрева в том числе, – и перед синтезом кДНК. **б** – Неблагоприятное влияние условий варианта 4 (депротенинизация смесью фенол-хлороформ без прогрева) на примере РНК *atpF*. Д – ПЦР с плазмидной ДНК, 1–4 – ПЦР с кДНК. М – маркер “100 bp”. Обратные транскриптазы: R – RevertAid, RP – RevertAid Premium, T – ThermoScript. Полосы в геле соответствуют следующим формам РНК: нс – несплайсированные; нс/с – гетеродуплексы из несплайсированных и сплайсированных нитей; с – сплайсированные; \* – неспецифичные. Здесь и на последующих рисунках на каждую дорожку брали 5 мкл реакционной смеси ПЦР с кДНК и 1–2 мкл ПЦР-продуктов с плазмидной ДНК.

При секвенировании полос промежуточной подвижности наблюдается следующая картина. Вначале регистрируется последовательность пиков, соответствующую одному экзону, затем начинается зона двойных пиков, соответствующая по длине размеру ПЦР-фрагмента с другого экзона, затем вновь идет последовательность, соответствующая интрону. Обычно в зоне двойных пиков более высокие из них соответствуют последовательности второго экзона, а низкие – равно по длине участка интрона (с точностью до 1–2 нуклеотидов). На рис. 1 это показано на примере секвенирования полосы с промежуточной подвижностью, полученной при считывании с кДНК *atpF* (рис. 1а). Самый короткий ампликон – *rps12-3'* – секвенирован до конца; он состоит последовательно из зоны первого экзона, зоны двойных пиков с преимущественным прочтением второго экзона (с последовательностью обратного праймера в конце), зоны интрона и зоны второго экзона (с последовательностью обратного праймера в конце) (не приведено). Это подтверждает предположение, что полосы с промежуточной подвижностью представлены гетеродуплексами двух форм ПЦР-продуктов.

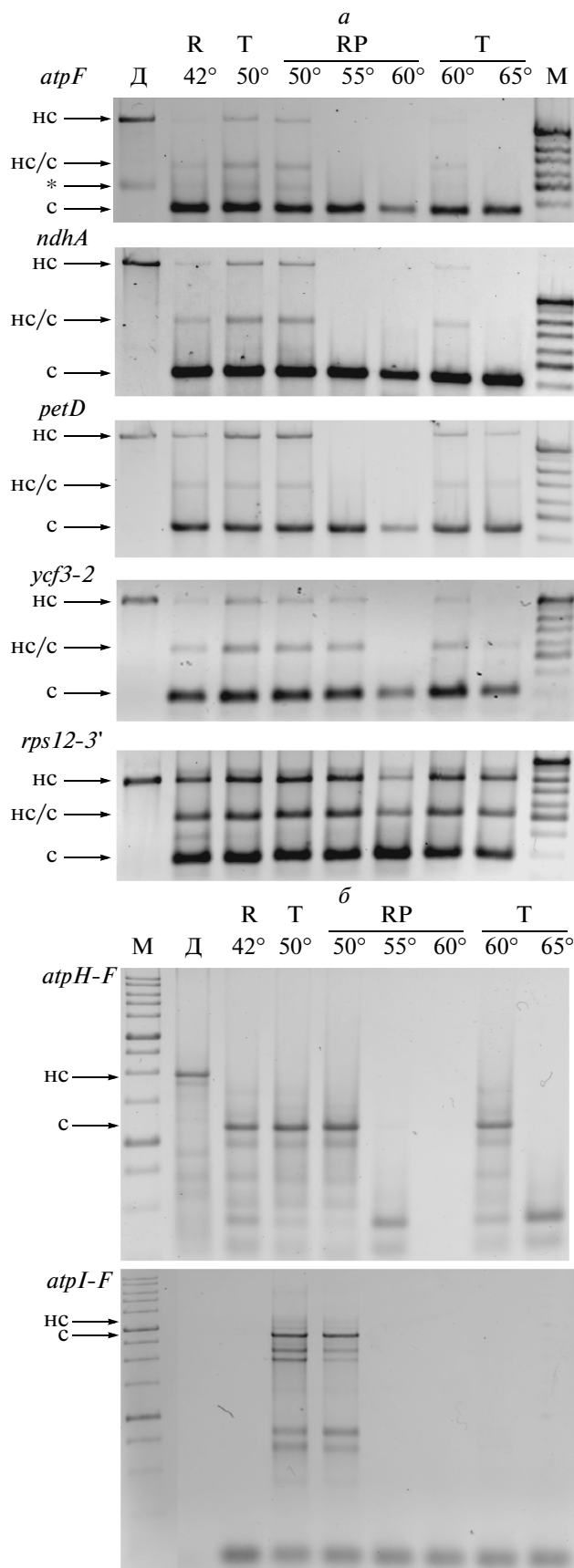
Полосы с промежуточной подвижностью в случае двух генов (*rps12-3'* и *ycf3-2*) появляются стабильно и четко, а в случае трех других (*atpF*, *ndhA*, *petD*) – слабо и заметны не всегда. Ампликоны генов *rps12-3'* и *ycf3-2* имеют меньшую длину, чем ампликоны трех других генов, что не способствует стабилизации гетеродуплексов. Ин-

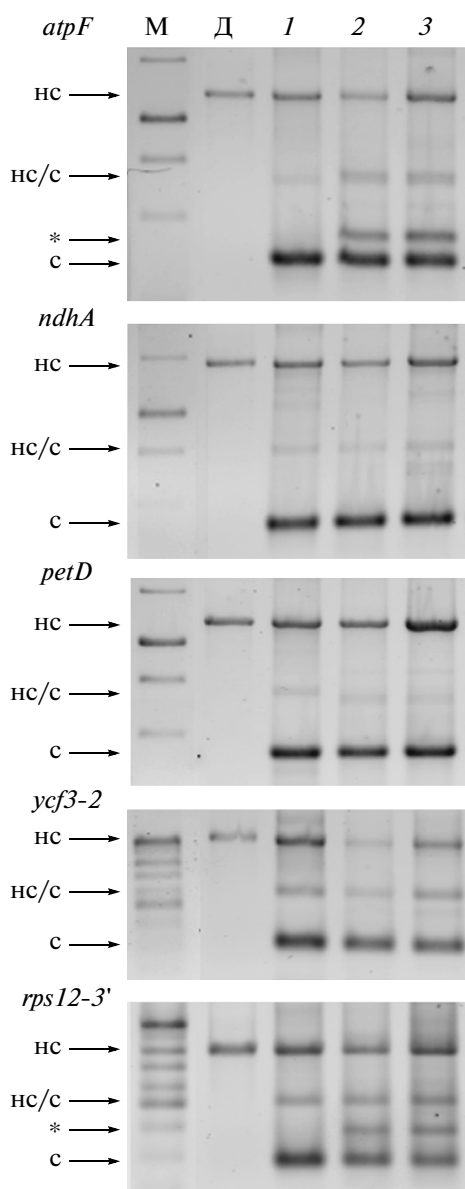
**Рис. 3.** Влияние температуры синтеза кДНК и использования ферментов различных производителей на относительный выход высокомолекулярных ПЦР-продуктов. *а* – Влияние условий синтеза кДНК на примере пяти генов. *б* – Влияние условий синтеза кДНК при удлинении анализируемого ампликона на примере оперона *atpHFA*. Д – ПЦР с плазмидной ДНК. Обратные транскриптазы: R – RevertAid, RP – RevertAid Premium, T – ThermoScript. 42–65° – температура синтеза кДНК (°C). М – маркер “100 bp” (*а*) или “1 kb” (*б*). Обозначение полос как на рис. 2. Для амплификации участка плазмидной ДНК использовали как стандартную (90 с), так и удлиненную (150 с) стадию синтеза (72°C).

трон *ycf3-2* по длине соответствует интрону *petD* и мало отличается от интрона *atpF*. Ампликоны генов *rps12-3'* и *ycf3-2* отличает то, что они простираются достаточно далеко по обе стороны от сайта сплайсинга (обе части  $\geq 100$  н.). В то же время, в остальных ампликонах один из экзонов представлен коротким фрагментом из 46, 43 и 18 п.н. (таблица). По-видимому, в гетеродуплексе комплементарные участки экзонов обеих нитей образуют двунитевые участки, а последовательность интрона образует петлю. Вероятно, для стабилизации такой структуры нужно, чтобы по обе стороны от петли находились достаточно длинные участки. Поэтому для минимизации возможности возникновения таких структур следует подбирать один из праймеров как можно ближе к границе экзона, в идеале – вплотную к сайту сплайсинга, как в случае ампликона *petD* (таблица, рис. 2–5).

### Инактивация ДНКазы I

Известно, что при повышенной температуре ионы  $Mg^{2+}$  способствуют гидролизу РНК и что хелатирование этих ионов при помощи ЭДТА способствует сохранению молекул РНК при повышенной температуре [12]. В первых опытах образцы РНК прогревали дважды: 1) для инактивации ДНКазы, после ферментативного удаления остатков ДНК из препарата хлоропластной РНК, и 2) для денатурации вторичных структур в РНК перед синтезом кДНК. Мы проверили несколько вариантов инактивации ДНКазы: прогрев без добавления ЭДТА, прогрев в присутствии ЭДТА, прогрев в присутствии ЭДТА непосредственно перед началом синтеза кДНК (для инактивации ДНКазы и денатурации вторичных структур в РНК одновременно) и депротенизация смесью фенол-хлороформ, с последующим переосаждением и без прогрева РНК перед синтезом кДНК (рис. 2*а*). Все эти способы не отличаются по выходу ПЦР-продуктов со сплайсированных форм РНК, тогда как выход ПЦР-продуктов с несплайсированных форм РНК зависит от способа инактивации ДНКазы. Если препарат прогревали без





**Рис. 4.** Зависимость относительного выхода высокомолекулярных ПЦР-продуктов от препарата ДНК-полимеразы. Инактивация ДНКазы I – однократный прогрев в присутствии ЭДТА (см. подписи к рис. 2 и текст), синтез кДНК обратной транскриптазой RevertAid Premium при 50°C. Д – ПЦР с плазмидной ДНК. ДНК-полимеразы: 1 – Encyclo; 2 – Taq-ДНК-полимераза (“Сибэнзим”); 3 – DreamTaq. М – маркер “1 kb” (*atpF*, *ndhA*, *petD*) или “100 bp” (*ycf3-2*, *rps12-3'*). Обозначение полос как на рис. 2.

добавления ЭДТА, то выход высокомолекулярных ампликонов всегда заметно меньше. Прогревание в присутствии ЭДТА увеличивает долю высокомолекулярных ампликонов. Отказ от прогревания (удаление ДНКазы смесью фенол-хлороформ) не улучшает ситуацию, напротив, этот способ также приводит к снижению выхода ампликонов некоторых мРНК, соответствующих несплайсированным формам РНК. Кроме того,

вариант с обработкой смесью фенол-хлороформ без прогревания РНК в некоторых случаях приводит к появлению неспецифических полос после ОТ-ПЦР (рис. 2б). Разница между одним и двумя прогреваниями невелика, однако, по совокупности наблюдений был сделан вывод, что однократное прогревание более предпочтительно.

#### **Синтез кДНК: температура и тип ревертазы**

Известно, что интроны группы 2 образуют множественные вторичные структуры [3]. Если синтез кДНК происходит при низких температурах (37–42°C), то ренатурация таких структур может препятствовать функционированию ревертазы и синтезу кДНК с интрон-содержащих участков РНК. Увеличение температуры синтеза кДНК должно способствовать матричному копированию интрон-содержащих участков РНК ревертазами. Мы изучили зависимость выхода ампликонов от температуры синтеза кДНК. Оказалось, что при 42°C количество интрон-содержащих ампликонов действительно меньше, чем при 50°C. Однако не исключено, что это может быть следствием не только увеличения температуры, но и использования разных ферментов (рис. 3а). Высокотемпературные ревертазы RevertAid Premium и ThermoScript обеспечивают наилучший выход высокомолекулярных фрагментов при температуре 50°C, при дальнейшем увеличении температуры количество таких фрагментов уменьшается. При 50°C достоверных различий в активности ревертаз RevertAid Premium и ThermoScript не было заметно. С увеличением температуры активность RevertAid Premium резко снижается, что заметно по уменьшению количества высокомолекулярных ампликонов при 55°C и низкомолекулярных при 60°C (рис. 3а). Активность ThermoScript снижается в меньшей степени: даже если синтез идет при 65°C, заметны несплайсированные формы РНК *rps12-3'* и *petD* (рис. 3а).

Чтобы выяснить, является ли активность используемых нами ферментов лимитирующей для анализа длинных нитей РНК, мы расширили амплифицируемую зону, используя праймеры для разных генов оперона *atpHFA* (рис. 3б). Эти праймеры не были оптимизированы для совместного использования, поэтому в этом случае наблюдается большое число дополнительных полос. Увеличение длины анализируемых фрагментов приводит к тому, что ПЦР-продуктов с интрон-содержащих молекул не наблюдается. Однако в случае длинных сплайсированных мРНК проявляется та же тенденция. Активность ревертаз RevertAid Premium и ThermoScript при 50°C не отличается, увеличение температуры синтеза снижает активность ферментов, особенно RevertAid Premium (*atpH-F*). Оба этих фермента при 50°C обеспечивают синтез фрагментов длиной 2500–3000 п.н. (*atpI-F*), тогда как ревертаза Re-

vertAid (42°C) — только фрагмента 1200 п.н. Отсутствие ампликонов с пластидной ДНК (*atpI-F*, воспроизводимый результат), возможно, вызвано неспособностью используемого препарата ДНК-полимеразы (“СибЭнзим”) обеспечивать синтез фрагментов длиной более 3000 п.н. даже за 2.5 мин.

#### ПЦР: препарат ДНК-полимеразы

Поэтому на следующем этапе проверяли, может ли соотношение высоко- и низкомолекулярных ампликонов в реакционной смеси зависеть от препарата Таq-ДНК-полимеразы (рис. 4). Используемая нами Таq-ДНК-полимераза компании “СибЭнзим” при амплификации кДНК всех генов дает более низкий выход высокомолекулярных ампликонов, чем два другие фермента. По сравнению с ней, полимеразы DreamTaq синтезируют такое же количество низкомолекулярных ампликонов и заметно большее количество высокомолекулярных. Полимераза Encyclo обеспечивает более интенсивный синтез как низко-, так и высокомолекулярных ПЦР-продуктов. В некоторых случаях использование Encyclo позволяет избавиться от неспецифичных продуктов (рис. 4 *atpF* и *rps12-3'*). Однако по соотношению несплайсированных и сплайсированных ампликонов для четырех генов более предпочтителен фермент DreamTaq, и только в случае ПЦР-продуктов *ycf3-2* фермент Encyclo дает при считывании более высокую долю высокомолекулярных ампликонов.

#### ПЦР: количество циклов

Если в ходе ПЦР короткие ампликоны синтезируются лучше, чем длинные, то относительная доля низкомолекулярных продуктов должна возрастать от цикла к циклу. Мы проверили, как изменяется соотношение низко- и высокомолекулярных продуктов в диапазоне от 15 до 40 циклов. При амплификации фрагментов четырех РНК заметных отличий не наблюдается. В случае гена *rps12-3'* заметно, что после небольшого числа циклов (15 и 20) высокомолекулярные полосы более интенсивны, чем низкомолекулярные, а после 35–40 циклов интенсивность низко- и высокомолекулярных полос примерно одинакова (рис. 5). Вероятно, число циклов важно не для всех ампликонов, но в реакции ОТ-ПЦР все же лучше проводить небольшое число циклов (в данном случае около 20).

#### Заключительные рекомендации

Приведенный анализ позволил выявить факторы, влияющие на относительный выход высокомолекулярных ампликонов, соответствующих несплайсированным формам РНК. Учет этих

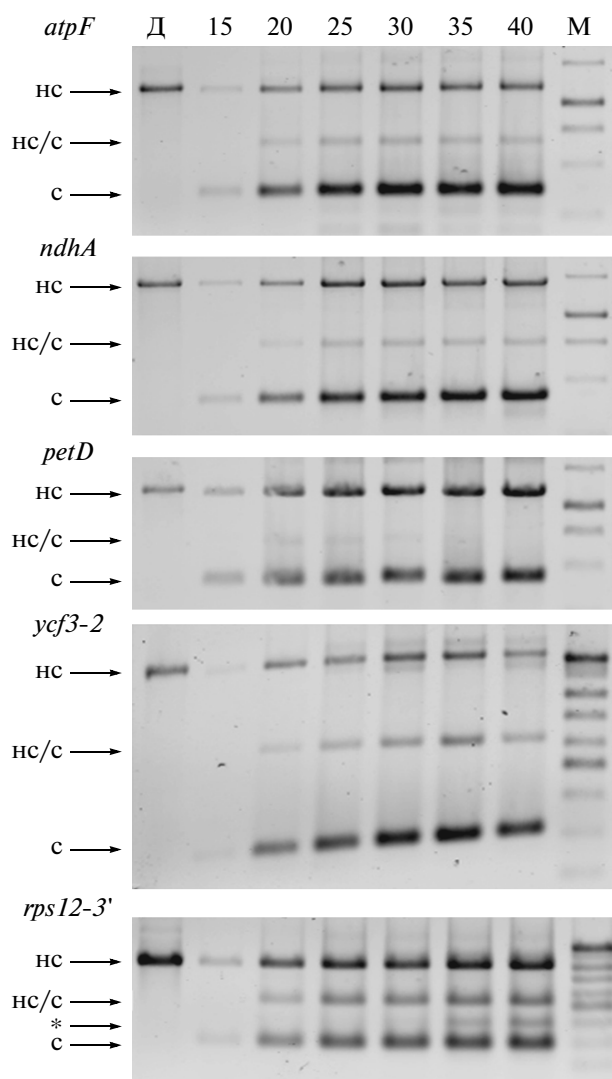


Рис. 5. Изменение спектра ПЦР-продуктов с увеличением числа циклов ПЦР. Инактивация ДНКазы I и синтез кДНК как на рис. 4. ДНК-полимераза DreamTaq. Д — ПЦР с пластидной ДНК. 15–40 — число циклов ПЦР при амплификации кДНК. М — маркер “1 kb” (*atpF*, *ndhA*, *petD*) или “100 bp” (*ycf3-2*, *rps12-3'*). Обозначение полос как на рис. 2.

факторов позволил модифицировать методику, уточнить условия и существенно увеличить долю длинных ампликонов по сравнению с короткими (сравнить рис. 2а дорожки 1 и рис. 5 дорожки 25). Сформулированы следующие рекомендации.

1. Конструировать праймеры к экзонам по обе стороны от сайта сплайсинга интрона, что позволяет одновременно анализировать сплайсированные и несплайсированные РНК. Предпочтительно один из праймеров подбирать к участку, расположенному возможно более близко к интрон-экзонной границе — для уменьшения вероятности формирования стабильных гетеродуплексов, соответ-



ствующих сплайсированной и интрон-содержащей нитям.

2. Инактивировать ДНКазу путем термической обработки в присутствии EDTA. Предпочтителен вариант, при котором ферментативное удаление остатков ДНК и синтез кДНК происходят неразрывно, и однократное прогревание препарата РНК преследует две цели: инактивацию ДНКазы и денатурацию вторичных структур РНК перед синтезом кДНК.

3. Проводить синтез кДНК при температуре 50°C, оптимальной для эффективности ревертаз RevertAid Premium и ThermoScript. Первая из них гораздо дешевле.

4. Проверять, какие из коммерческих препаратов Таq-ДНК-полимеразы дают лучший выход высокомолекулярных ПЦР-продуктов относительно низкомолекулярных. В данном случае для синтеза большинства мРНК оптимальна ДНК-полимераза DreamTaq, а для гена *ycf3-2* – Encyclo.

5. От некоторых неспецифичных ампликонов можно избавиться подбором ферментов – как ревертазы (рис. 2б), так и ДНК-полимеразы (рис. 4).

6. Реакцию ПЦР целесообразно ограничивать небольшим числом циклов, в нашем случае – это около 20.

Оптимизированная с учетом этих рекомендаций методика позволяет успешно анализировать как сплайсированные, так и несплайсированные РНК белок-кодирующих генов в хлоропластах кукурузы. В таком виде эта методика может быть применена для анализа соотношения интрон-содержащих и сплайсированных РНК при изучении эффективности сплайсинга РНК под действием различных внешних и внутренних факторов.

Авторы благодарят Е.С. Пожидаеву за ценный совет.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-90052-Бел и 10-04-00594).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haugen P., Simon D.M., Bhattacharya D. 2005. The natural history of group I introns. *Trends Genet.* **21**, 111–119.
2. Koonin E.V. 2006. The origin of introns and their role in eukaryogenesis: a compromise solution to the introns-early versus introns-late debate? *Biol. Direct.* **1**, 22. doi:10.1186/1745-6150-1-22
3. de Longevialle A.F., Small I.D., Lurin C. 2010. Nuclearly encoded splicing factors implicated in RNA splicing in higher plant organelles. *Mol. Plant.* **3**, 691–705.
4. Herrin D.L., Chen Y.F., Schmidt G.W. 1990. RNA splicing in *Chlamydomonas* chloroplasts. Self-splicing of 23 S preRNA. *J. Biol. Chem.* **265**, 21134–21140.
5. Rock C.D., Barkan A., Taylor W.C. 1987. The maize plastid *psbB-psbF-petB-petD* gene cluster: spliced and unspliced *petB* and *petD* RNAs encode alternative products. *Curr. Genet.* **12**, 69–77.
6. Hess W.R., Hoch B., Zeltz P., Hübschmann T., Kössel H., Börner T. 1994. Inefficient *rp12* splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell.* **6**, 1455–1465.
7. Jenkins B.D., Kulhanek D.J., Barkan A. 1997. Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell.* **9**, 283–296.
8. Schmitz-Linneweber C., Williams-Carrier R.E., Williams-Voelker P.M., Kroeger T.S., Vichas A., Barkan A. 2006. A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast *rps12* pre-mRNA. *Plant Cell.* **18**, 2650–2663.
9. Ueda M., Nishikawa T., Fujimoto M., Takanashi H., Arimura S., Tsutsumi N., Kadowaki K. 2008. Substitution of the gene for chloroplast RPS16 was assisted by generation of a dual targeting signal. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 1566–1575.
10. Kolodner R., Tewari K.K. 1972. Molecular size and conformation of chloroplast deoxyribonucleic acid from pea leaves. *J. Biol. Chem.* **247**, 6355–6364.
11. Krapp A., Hofmann B., Schäfer C., Stitt M. 1993. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the ‘sink regulation’ of photosynthesis? *Plant J.* **3**, 817–828.
12. Wiame I., Remy S., Swennen R., Sági L. 2000. Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *Biotechniques.* **29**, 252–256.