



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.218

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11153

Идентификация электрофоретическим способом продуктов рестрикционного анализа по сайту GATC геномной ДНК пшеницы при солевом стрессе

Дмитрий Николаевич Федорин¹,

Виктория Олеговна Чуйкова¹, Александр Трофимович Епринцев^{1✉}

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru✉

Аннотация. Современные методы исследования нуклеиновых кислот показали наличие в составе ДНК модифицированных азотистых оснований, главным образом, в виде их метилирования. Несмотря на то, что за последние несколько десятилетий было проделано много работы по выяснению роли 5-метилцитозина, только в последнее время было признано, что N(6)-метиладенин (^{6m}A) - N6-метиладенин присутствует в количественных и биологически активных уровнях в ДНК эукариотических клеток. Установлено, что содержание ^{6m}A может варьировать более чем на порядок в пределах изогенной популяции организмов и уровни ^{6m}A у этих организмов могут быть особенно чувствительны к незначительным изменениям в окружающей среде, например, к стрессовым факторам. Метилспецифичная рестрикция эндонуклеазой Mal I позволила выявить изменение аденилатного метильного статуса ДНК клеток листьев пшеницы в условиях солевого стресса. Это рестрицирующий фермент, распознающий метилированный аденин в составе последовательности нуклеотидов GATC и осуществляющий симметричную рестрикцию по данному сайту. Применение гуанидин-изотиоцианатной экстракции позволило выделить общую ДНК из клеток листьев пшеницы практически без следов деградации, что является необходимым условием для дальнейших аналитических исследований. Использование электрофоретического метода, обеспечивающего разделение фрагментов рестрикции на основе их заряда и размера, позволило оценить метильное состояние исследуемой последовательности ДНК листьев пшеницы в разных экспериментальных условиях. Анализ результатов рестрикционного анализа образцов ДНК пшеницы в разные часы засоления указывает, что в исследуемых образцах значительно меняется характер распределения продуктов рестрикции на основе их размера, что свидетельствует об изменении метильного статуса аденина в составе сайта GATC. Результаты денситометрии свидетельствуют об увеличении продуктов рестрикции по анализируемым сайтам. Относительно контрольного варианта, где обнаружены, в основном, высокомолекулярные рестрикционные фрагменты, на 24 час инкубации растений в растворе хлорида натрия основная доля продуктов рестрикции эндонуклеазой Mal I приходилась на низкомолекулярные. Увеличение продуктов рестрикции геномной ДНК пшеницы на 24 час эксперимента свидетельствует о большем количестве метилированного аденина в составе сайта GATC в данный период эксперимента. Изменение характера распределения метилирования аденина может являться регуляторным механизмом контроля адаптивной реакции клеточного метаболизма листьев пшеницы на уровне экспрессионной активности соответствующих генов.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, рестрикция, аденин, метилирование ДНК, солевой стресс.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

Для цитирования: Федорин Д.Н., Чуйкова В.О., Епринцев А.Т. Идентификация электрофоретическим способом продуктов рестрикционного анализа по сайту GATC геномной ДНК пшеницы при солевом стрессе // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 2. С. 299-306. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11153>



Original article

Electrophoretic identification of restriction analysis products at the GATC site of wheat genomic DNA under salt stress

Dmitry N. Fedorin¹, Victoria O. Chuikova¹, Alexander T. Eprintsev¹✉

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, bc366@bio.vsu.ru✉

Abstract. Modern methods for the study of nucleic acids have shown the presence of modified nitrogenous bases in DNA, mainly, in the methylated form. Although many study were performed over the past few decades to elucidate the role of 5-methylcytosine, it has only recently been recognized that N(6)-methyladenine (6mA) - N6-methyladenine is present in quantitative and biologically active levels in the DNA of eukaryotic cells. It was established that 6mA content can vary by more than an order of magnitude within an isogenic population of organisms and 6mA levels in these organisms can be particularly sensitive to minor changes in the environment, for example, to stress factors. Methyl-specific restriction using Mal 1 endonuclease allowed to reveal changes in the adenylate methyl status of DNA in leaf cells of wheat under salt stress. This is a restriction enzyme that recognizes methylated adenine in the GATC nucleotide sequence and performs a symmetrical restriction at this site. The use of guanidine-isothiocyanate extraction allowed to isolate total DNA from leaf cells of wheat with virtually no signs of degradation, which is a necessary condition for further analytical studies. The use of the electrophoretic method, which ensures the separation of restriction fragments based on their charge and size, allowed to estimate the methyl state of the studied wheat leaf DNA sequence under different experimental conditions. Analysis of the results of restriction analysis of wheat DNA samples at different hours of salinity indicated that the distribution of restriction products based on their size significantly changes in the studied samples, which indicated a change in the methyl status of adenine in the GATC site. The results of densitometry indicate an increase in restriction products at the analysed sites. In comparison with the control variant, where mainly high molecular weight restriction fragments were found, at 24 h of incubation of plants in sodium chloride solution, the main share of products obtained by restriction with Mal 1 endonuclease was presented by low molecular weight fragments. An increase in wheat genomic DNA restriction products at the 24th hour of the experiment indicates a higher amount of methylated adenine in the GATC site during this period of the experiment. The changed in the distribution of adenine methylation may be a regulatory mechanism for the control of the adaptive response of cell metabolism in wheat leaves at the expression level of the corresponding genes.

Keywords: *Triticum aestivum*, restriction, adenine, DNA methylation, salt stress.

Acknowledgments: this work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a state order for universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project no. FZGU-2023-0009

For citation: Fedorin D.N., Chuikova V.O., Eprintsev A.T. Electrophoretic identification of restriction analysis products at the GATC site of wheat genomic DNA under salt stress. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 299-306. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11153>

Введение

Солевой стресс, как важный фактор в исследовании адаптивной реакции растений, исследуется на уровне ферментативных систем [1, 2]. Одним из основных механизмов адаптации растений к высокому содержанию солей является ограничение поступления Na^+ в особо чувствительные к засолению ткани. Для осуществления данного механизма важное значение играют цитоплазма и вакуоль,

которые обеспечивают осмотический баланс в том числе за счет дополнительного биосинтеза осмолитов и накопления ионов калия. Биосинтетические процессы, направленные на адаптацию к засолению, требуют притока энергии, необходимой для координации углеводного и азотного обмена [3]. Полученные ранее данные свидетельствуют, что солевой стресс вызывает изменение содержания мРНК генов ряда изоферментов, что коррелирует с их ферментативной активностью в данных условиях. При этом,



между метильным статусом промоторов генов, в составе которых обнаружены CpG-островки, и уровнем их транскриптов наблюдается зависимость [4, 5]. Несмотря на то, что за последние несколько десятилетий было проделано много работы по выяснению роли 5-метилцитозина, только в последнее время было признано, что N6-метиладенин (^{6m}A) присутствует в количественных и биологически активных уровнях в ДНК эукариотических клеток. Несколько исследований показали, что метилирование N6-аденина коррелирует с повышенной экспрессией генов [6]. Анализ кристаллической структуры ДНК показал, что ^{6m}A может изменить ее вторичную структуру за счет изменения как стабильности пары оснований, так и укладки оснований [7], что напрямую отражается в характере взаимодействия с факторами транскрипции.

Относительно немного данных имеется о функциональной важности ДНК-^{6m}A в геномах эукариотических организмов, в том числе и о роли ^{6m}A в динамической регуляции биологических процессов [8, 9]. Предполагается, что уровни ^{6m}A у эукариот могут быть особенно чувствительны к незначительным изменениям в окружающей среде, например, к стрессовым факторам [6, 10]. В частности, установлена светозависимость скорости функционирования аденин-ДНК-метилтрансфераз, что находит свое отражение в увеличении числа метилированных аденинов в сайтах GATC. Появление в клетке активной формы фитохрома при облучении красным светом вызывает увеличение доли метилированных аденинов в промоторе гена цитратсинтазы. Механизмом регуляции в данном случае является контроль экспрессии гена *nbamt1* [11]. Целью данного исследования являлось изучение изменения аденилатного метильного статуса ДНК по сайтам GATC в листьях пшеницы в условиях засоления 150 мМ хлоридом натрия.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования были использованы листья 14-дневной пшеницы (*Triticum aestivum* L.), которая была выращена гидропонным способом при дневном 12 часовом световом дне с интенсивностью света 90 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ при температуре окружающей среды 25°C.

Постановка эксперимента по действию солевого стресса осуществлялась путём помещения растений из опытной группы, с предварительно удаленной корневой системой, в 150 мМ водный раствор хлорида натрия (NaCl) на 24 часа. В качестве контрольной группы использовались растения, помещённые в воду на 24 часа. У данной группы корневая система также предварительно удалялась. Образцы для исследования отбирались через 6, 12 и 24 часа от начала эксперимента.

Геномную ДНК из листьев пшеницы выделяли методом фазового распределения, основанном на фенол-хлороформной экстракции. Специфическим осадителем в нашей работе выступал ацетат аммония [12].

Для обнаружения метилированного статуса геномной ДНК по аденину использовали фермент Mal 1 (SibEnzyme, Россия). Картину специфического гидролиза геномной ДНК из листьев пшеницы в условиях различного светового режима определяли методом ограниченного рестрикционного анализа (расщепление молекулы ДНК по специфическим сайтам) при обработке 2 мкг ДНК, при помощи 1 единицы фермента в течение 4 часов при 37°C [13].

Качественный анализ ДНК проводили путем электрофоретического исследования в геле 1% агарозы в течение 40 мин при напряжении 60 В. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот осуществляли в электродном (ТАЕ) буфере: 200 мМ Трис, 100 мМ уксусная кислота, 50 мМ ЭДТА, рН 8.4. Красителем

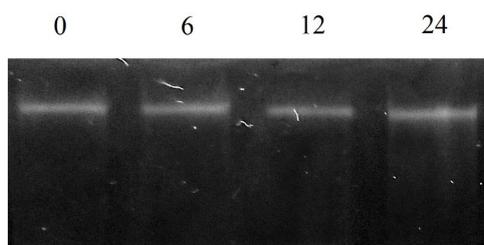


Рис. 1. Геномная ДНК из листьев пшеницы в условиях засоления. 0 – растения, экспонируемые в стандартных условиях (контроль), 6 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 6 часов, 12 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 12 часов, 24 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 24 часов.

Fig. 1. Genomic DNA from wheat leaves under salt stress conditions. 0 – plants incubated under standard conditions (control), 6 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 6 hours, 12 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 12 hours, 24 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 24 hours.

выступал бромистый этидий, являющийся интеркалирующим и флуоресцирующим при встраивании в молекулу нуклеиновой кислоты.

Денситометрический анализ гелей осуществляли с применением программного обеспечения GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com).

Опыты проводились в 3-х кратной биологической и 4-х кратной аналитической повторности. В таблицах и на рисунках представлены данные опытов, в которых каждое значение это среднее арифметическое, посчитанное по результатам трех повторностей. Данные были подвергнуты двустороннему дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием программного обеспечения для анализа данных STATISTICA версии 9 ((Statsoft Wipro, East Brunswick, NJ, USA). Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (SD). Обсуждаются статистически значимые различия при $p < 0.05$ [14].

Обсуждение результатов

Для оценки метильного статуса геномной ДНК листьев пшеницы в условиях засоления 150 мМ хлоридом натрия из исследуемых образцов была выделена геномная ДНК с использованием метода гуанидин-изотиоцианатной экстракции без

следов деградации, что является необходимым условием для дальнейшего проведения аналитических исследований (рис. 1).

Для анализа метильного статуса аденина (по сайту GATC) в составе ДНК был применен метод рестрикционного анализа с использованием эндонуклеазы *Mal* 1, обеспечивающий симметричное расщепление ДНК по сайту $G^{m^6}A^T C$, в составе которого аденин метилирован [15].

Полученные результаты метилспецифичной рестрикции с применением эндонуклеазы *Mal* 1 свидетельствуют об изменении метильного статуса ДНК клеток листьев пшеницы в условиях солевого стресса. При воздействии хлорида натрия на растения в геноме ДНК исследуемых растений наблюдается существенное отличие в количестве продуктов рестрикционного анализа, что находит отражение в изменении числа рестрикционных фрагментов на агарозном геле после электрофоретического разделения. Агарозный гель позволяет эффективно разделить продукты рестрикции на основании их размера. Величина отрицательного заряда нуклеиновой кислоты слабо зависит от pH раствора, вследствие чего разделение на фракции происходит в основном за счет различия в линейных размерах молекул [16].

Установлено, что значительно меняется характер распределения метилированного аденина в составе GATC сайтов.

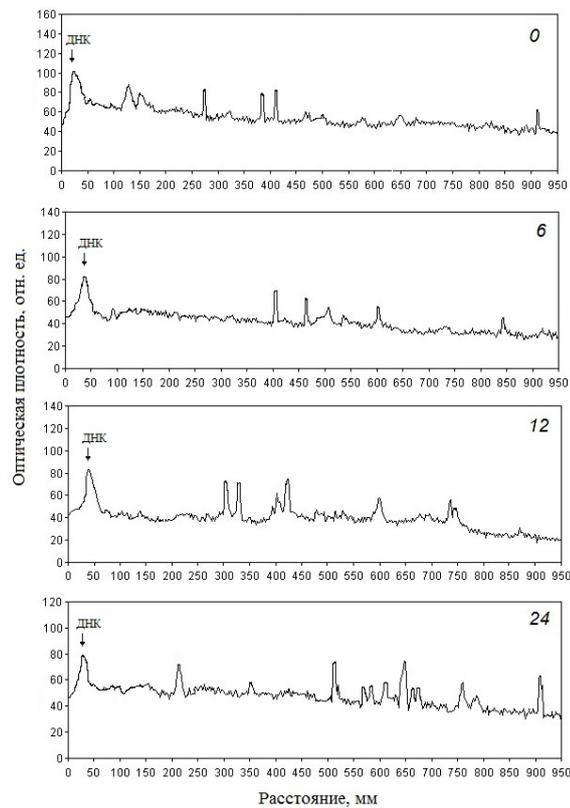


Рис. 2. Денситограмма образцов геномной ДНК пшеницы при солевом стрессе, подвергшихся рестрикции эндонуклеазой Mal 1. ДНК – геномная ДНК из листьев пшеницы. 0 – растения, экспонируемые в стандартных условиях (контроль), 6 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 6 часов, 12 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 12 часов, 24 – растения, выдержанные в 150 мМ хлориде натрия в течение 24 часов.

Figure 2. Densitogram of wheat genomic DNA samples under salt stress subjected to restriction with Mal 1 endonuclease. DNA - genomic DNA from wheat leaves. 0 – plants incubated under standard conditions (control), 6 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 6 hours, 12 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 12 hours, 24 – plants incubated in 150 mM sodium chloride for 24 hours.

Об этом свидетельствуют результаты рестрикционного анализа, в ходе которого установлено изменение в размерах продуктов специфического гидролиза по сайтам GATC. Следовательно, изменение паттерна метилирования аденина носит солезависимый характер. При денситометрическом анализе результатов электрофоретического разделения продуктов специфического рестрикционного анализа геномной ДНК пшеницы по сайтам GATC в разные часы засоления наблюдается изменение профиля метилирования анализируемой ДНК по аденину. Результаты денситометрии свидетельствуют об увеличении продуктов рестрикции по

анализируемым сайтам (рис. 2). Относительно контрольного варианта, где обнаружены, в основном, высокомолекулярные рестрикционные фрагменты, на 24 час инкубации растений в растворе хлорида натрия основная доля продуктов рестрикции эндонуклеазой Mal 1 приходилась на низкомолекулярные. Следовательно, к 24 часу солевого стресса в растениях пшеницы увеличился адениновый метильный статус геномной ДНК.

Анализ результатов рестрикционного анализа образцов ДНК пшеницы в разные часы засоления указывает, что в исследуемых образцах значительно меняется ха-

Таблица 1. Распределение продуктов рестрикции геномной ДНК пшеницы эндонуклеазой Mal 1 при засолении

Table 1. Distribution of restriction products of wheat genomic DNA by Mal 1 endonuclease under salt stress

Расстояние от стартовой точки, мм	Время экспозиции в 150 мМ растворе хлорида натрия, час			
	0	6	12	24
125	+			
150	+			
210				+
270	+			
300			+	
330			+	
350				+
370	+			
400			+	
410	+	+		
420			+	
460		+		
500		+		
510				+
530		+		
560				+
570				+
600		+	+	
610				+
650				+
660				+
670				+
740			+	
750			+	
760				+
780				+
850		+		
910	+			+

рактически равномерное распределение продуктов рестрикции, пройденное ими расстояние при электрофоретическом разделении в 1% агарозном геле от стартовой точки, что свидетельствует об изменении метильного статуса аденина в составе сайта GATC (табл. 1). Показано, что для контрольных растений (0 часов) характерно наличие крупных продуктов рестрикции, о чем свидетельствуют фрагменты, прошедшие расстояние от 125 до 410 мм в гелевой пластинке. На 6 и 12 час экспозиции растений в 150 мМ растворе хлорида натрия наблюдается изменение размера рестрикционных фрагментов, которые имеют меньший размер по сравнению с

рестрикционными фрагментами контрольных растений. В этих образцах рестрикционные фрагменты располагались в пределах от 300 до 750 мм от стартовой точки на геле.

К 24 часу экспозиции растений пшеницы в 150 мМ растворе хлорида натрия обнаружено максимальное количество продуктов рестрикции по сайту GATC, которое составляет 12. Увеличение продуктов рестрикции геномной ДНК пшеницы на 24 час эксперимента свидетельствует о большем количестве метилированного аденина в составе сайта GATC в данный период эксперимента. При этом основное количество рестрикционных фрагментов имеет небольшой размер, что



отражается в пройденном ими расстоянии от начала геля. 10 из 12 продуктов рестрикции находились в пределах от 510 до 910 мм от стартовой точки на гелевой пластинке.

Заключение

Проведенные исследования по метил-специфичной рестрикции геномной ДНК пшеницы с применением эндонуклеазы Mal 1 свидетельствуют об изменении ее метильного статуса в условиях солевого стресса. Изменение количества продуктов рестрикции указывает на различие в метильном статусе ДНК пшеницы в зависимости от времени действия солевого стресса на растения. Увеличение количества продуктов рестрикции к 24 часу экспозиции растений в 150 мМ растворе хлорида натрия указывает на увеличение количества метилированного аденина в сайтах GATC, специфически гидролизуемых эндонуклеазой Mal 1.

Список литературы/References

1. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K., Bohnert H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2000; 51: 463-499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>
2. Bajji M., Kinet J.-M., Lutts S. Osmotic and ionic effects of NaCl on germination, early seedling growth, and ion content of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Canadian Journal of Botany*. 2002; 80: 297-304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/b02-008>
3. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7: 1042. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01042>
4. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Anokhina G.B., Igamberdiev A.U. Effects of light, anoxia and salinity on the expression

Следовательно, изменение паттерна метилирования аденина носит солезависимый характер. По мере развития адаптивной реакции клеточного метаболизма на засоление в клетках листьев пшеницы увеличивается метильный статус геномной ДНК по аденину, что обусловлено активацией аденин-ДНК-метилтрансферазой. Метилирование N6-аденина вызывает увеличение экспрессионной активности генов [6], в том числе и генов, ответственных за синтез осмолитов, что может выступать механизмом адаптации к действию стрессового фактора.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

of dihydroxyacid dehydratase in maize. *Journal of Plant Physiology*. 2021; 265: 153507.

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153507>

5. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Cherkasskikh M.V., Igamberdiev A.U. Effect of Salt Stress on the Expression and Promoter Methylation of the Genes Encoding the Mitochondrial and Cytosolic Forms of Aconitase and Fumarase in Maize. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22: 6012. <https://doi.org/10.3390/ijms22116012>

6. Rogers J.C., Rogers S.W. Comparison of the effects of N6-methyldeoxyadenosine and N5-methyldeoxycytosine on transcription from nuclear gene promoters in barley. *Plant Journal*. 1995; 7: 221-233. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1995.7020221.x>

7. O'Brown Z.K., Greer E.L. N6-methyladenine: a conserved and dynamic DNA mark. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016; 945: 213-246. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_10



8. Fu Y., Luo G-Z., Chen K., Deng X., Yu M., Han D., Hao Z., Liu J., Lu X., Dore L.C., Weng X., Ji Q., Mets L., He C. N6-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. *Cell*. 2015; 161: 879-892. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.010>
9. Jia G., Fu Y., Zhao X., Dai Q., Zheng G., Yang Y., Yi C., Lindahl T., Pan T., Yang Y-G., He C. N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*. 2011; 7: 885-887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>
10. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2012; 13: 484-492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
11. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Igamberdiev A.U. Light Dependent Changes in Adenylate Methylation of the Promoter of the Mitochondrial Citrate Synthase Gene in Maize (*Zea mays* L.) Leaves. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23: 13495. <https://doi.org/10.3390/ijms232113495>
12. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*. 2019; 36: 116-117. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
13. Siwek W., Czapinska H., Bochtler M., Bujnicki J.M., Skowronek K. Crystal structure and mechanism of action of the N6-methyladenine-dependent type IIM restriction endonuclease R. DpnI. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 7563-7572. <https://doi.org/10.1093/nar/gks428>
14. Lakin G.F. Biometrics. M.: Higher school, 1990. 351p. (In Russ.)
15. Lacks S., Greenberg B. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *The Journal of Biological Chemistry*. 1975; 250: 4060-4066.
16. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Slavinskaya G.V., Drozdova N.V. Pigmenty pishchevyh proizvodstv (melanoidiny). M: Delhi print. 2008. 246 p. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Д.Н. Федорин – доцент кафедры биохимии и физиологии клетки, доцент, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

В.О. Чуйкова – бакалавр кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Т. Епринцев – заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, профессор, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

D.N. Fedorin – Associate Professor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Associate Professor, Candidate of Biological Sciences. Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

V.O. Chuykova – Bachelor of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

A.T. Eprintsev – Head of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Professor, Doctor of Biological Sciences. Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 06.02.2023; одобрена после рецензирования 11.04.2023; принята к публикации 19.04.2023.

The article was submitted 06.02.2023; approved after reviewing 11.04.2023; accepted for publication 19.04.2023.