



УДК 577.113.083

Выделение и идентификация генов сукцинатдегидрогеназы мембранными методами

© 2021 Селиванова Н.В., Бакарев М.Ю., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 24.01.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3643

Важнейшим этапом подготовки биологических образцов для проведения биохимических и/или диагностических процессов является выделение нуклеиновых кислот из образца. Выбор метода выделения РНК зависит прежде всего от поставленных задач, а также от ряда требований, основными из которых являются следующие: экономичность и простота метода, высокий выход выделяемой РНК, а также достаточная степень очистки конечного продукта. Целью данной работы являлась идентификация генов сукцинатдегидрогеназы в клетках печени крыс с использованием силикагельной мембраны для выделения суммарной клеточной РНК. Набор PureLink®RNA MiniKit (Invitrogen, США) позволил получить препарат суммарной РНК практически без следов деградации, что подтверждается содержанием 28S рРНК примерно в три раза превышающим содержание 18S рРНК. Технология PureLink® обеспечила высокий выход РНК. Важным преимуществом данного метода явилось также то, что он не требует экстрагирования токсичными растворителями (фенол/хлороформ), центрифугирования с CsCl или LiCl и осаждения спиртом, т.е. использования веществ, являющихся ингибиторами ПЦР. Кроме того, в связи с малой сменой наконечников и эппендорфов, возможность загрязнения значительно сокращена, что подтверждено спектрофотометрически (соотношение A_{260}/A_{280} для выделенного препарата РНК составило 2.03, а A_{260}/A_{230} – 1.98, что характеризует его как высокоочищенный). Таким образом, была подобрана эффективная методика выделения суммарной клеточной РНК, не имеющая в своем составе примесей посторонних нуклеиновых кислот. Чистая РНК, полученная в ходе выделения с применением силикагельной мембраны, в дальнейшем применяли для получения комплементарной ДНК. Полученная кДНК, путём применения метода реакции обратной транскрипции, использовалась в дальнейшем для количественной оценки содержания транскриптов генов, кодирующих субъединицы А и В (*sdha* и *sdhb*) сукцинатдегидрогеназы. Проведенный в дальнейшем ПЦР-анализ показал, что подобранные нами праймеры являются специфичными и могут быть использованы в дальнейших исследованиях по определению скорости транскрипции генов *sdha* и *sdhb* сукцинатдегидрогеназы у крыс в норме и при различных патологиях.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа, РНК, силикагельная мембрана, выделение нуклеиновых кислот, электрофорез.

Введение

Выделение РНК – довольно трудоемкий процесс. В основном проблемы связаны с деградацией РНК, низким выходом и/или чистотой, а также с загрязнением ДНК [1]. Кроме того, различные типы образцов имеют свои собственные уникальные особенности, которые требуют особого внимания. Например, наличие ингибиторов, в качестве которых могут выступать полифенолы, гу-

миновые/фульвокислоты, дубильные вещества и т. д., совместно осаждаются с РНК и могут ингибировать количественную ПЦР. Поэтому при выборе метода выделения РНК обязательно учитывают такие показатели, как быстрота метода, высокий выход продукта, высокая пропускная способность метода, значительная степень чистоты рибонуклеиновой кислоты и др. [2, 3].

Самым распространенным методом извлечения РНК является гуанидинин-

тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция. Гуанидин-тиоцианат денатурирует белки, разрушает водородную связь молекул воды и служит хаотропным агентом. Использование смеси фенол-хлороформ позволяет очистить образец от белков и других органических веществ [4, 5]. Однако данный метод характеризуется высоким риском загрязнения различными примесями, которые могут в дальнейшем ингибировать полимеразу, и не обеспечивает сохранность выделенной нуклеиновой кислоты, что необходимо для успешного проведения дальнейших исследований [6].

Одним из наиболее простых и часто используемых является метод выделения нуклеиновых кислот, предложенный Бум с соавторами (Boom et al., 1990) [7]. Он также основан на применении для лизиса клеток сильного хаотропного вещества – гуанидин изотиоционата. Дальнейшая очистка РНК от примесей осуществляется с помощью сорбции нуклеиновых кислот на носителе (например, например, частицами силики (SiO_2) в качестве абсорбента). Для того, чтобы связать отрицательно заряженный полимер (РНК), нужна поверхность с противоположным зарядом. Но есть одна проблема – если поверхность будет иметь постоянный заряд, нуклеиновая кислота прочно свяжется на поверхности, и мы получим необратимую сорбцию. Поэтому, чтобы

создать управляемую сорбцию, используют соли, которые создают «шубу» из противоположного заряда на поверхности нуклеиновой кислоты и обеспечивают связывание с функциональной поверхностью (рис. 1). Чтобы ионы соли своим положительным зарядом могли выполнить роль мостика, функциональная поверхность также должна быть заряжена отрицательно.

РНК плотно связывается с носителем, и последующая отмывка удаляет все загрязнения. Чтобы сделать сорбцию обратимой, нужно удалить ионы соли (или уменьшить их концентрацию), и нуклеиновая кислота перестанет удерживаться поверхностью и будет десорбирована. Очищенные молекулы нуклеиновых кислот могут быть элюированы при низкой ионной силе ($\text{pH} \geq 7$) с помощью ТЕ-буфера (название буфера является аббревиатурой от его компонентов буферного вещества Трис и ЭДТА, хелатирующего катионы металлов или дистиллированной воды; однократный буфер состоит из 10 мМ Трис, $\text{pH} 8,0$ и 1 мМ ЭДТА). Метод удобен и пригоден для подготовки образца к проведению ПЦР.

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ; КФ 1.3.99.1) является частью как цикла лимонной кислоты, так и дыхательной цепи переноса электронов. В ЦТК СДГ окисляет сукцинат до фумарата. Данный фермент найден практически во всех ис-

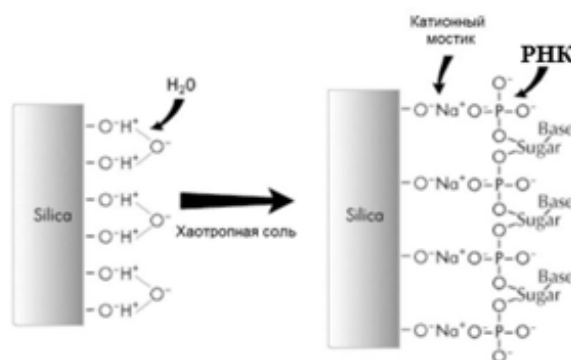


Рис. 1. Взаимодействие РНК и силикагельной мембраны. Наличие положительно заряженных ионов соли создает катионный мостик между отрицательными зарядами на поверхности и на нуклеиновой кислоте [7].

Fig. 1. Interaction of RNA and a silica gel membrane. The presence of positively charged salt ions creates a cationic bridge between negative charges on the surface and on the nucleic acid [7].

следованных организмах. Даже некоторые анаэробные прокариоты содержат множественные гены, кодирующие комплекс II [8]. Эукариотический фермент состоит из 4 субъединиц, кодируемых ядерным геномом. СДГ-единственный комплекс ЭТЦ, в котором отсутствуют субъединицы, кодируемые митохондриальным геномом, и единственный дыхательный комплекс, который не перекачивает протоны через внутреннюю мембрану во время своего каталитического цикла [9]. Так как сукцинатдегидрогеназа одновременно участвует в функционировании и цикла Кребса, и электронтранспортной цепи [10], регулируя ее активность, можно корректировать характер протекания метаболических процессов в клетке с целью приспособления организма к условиям окружающей среды. Регуляция активности ферментов с помощью изменения скорости работы их генов считается распространенным способом контроля метаболизма в клетке. В связи с этим целью данной работы явилось выделение РНК с помощью силикагельной мембраны для идентификации генов сукцинатдегидрогеназы из печени крыс.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования выступали самцы крыс (*Rattus norvegicus* L.). Их возраст составлял 3 месяца, а вес животных варьировался в диапазоне от 180 до 200 г. Работа выполнена в соответствии с санитарными правилами для вивария и нормами гуманного обращения с лабораторными животными.

Для выделения суммарной РНК использовали набор PureLink®RNAMiniKit (Invitrogen, США). Процесс осуществляется на спин-колонках; образцы гомогенизировали и лизировали в присутствии

хаотропной соли, наносили на спин-колонку, отмывали от загрязнений и элюировали чистый препарат РНК в соответствии с протоколом производителя. Для получения РНК, не содержащей примеси ДНК, проводилась ДНКазная обработка образца непосредственно на спин-колонке.

Концентрацию экстрагированной РНК определяли спектрофотометрически на СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) по поглощению при 260 нм (A₂₆₀). В качестве показателей контаминации белками и полисахаридами использовали соотношения A₂₆₀/A₂₈₀ и A₂₆₀/A₂₃₀[11].

Анализ качества выделенной РНК осуществляли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Гель окрашивали 1% раствором этидиум бромид (BioChemica, AppliChem). Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием набора реактивов для обратной транскрипции с MMLV-RN и праймерами oligo(dT)₁₆ (Диаэм, Россия) для синтеза первой цепи кДНК согласно инструкции производителя.

С использованием нуклеотидных последовательностей, взятых из международной базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genes/>), с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), нами были разработаны специфические праймеры к генам *sdha* и *sdhb* крысы (таблица 1).

При помощи набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия) осуществляли полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с генспецифичными праймерами на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Параметры амплификации были следующие: предварительная денатурация – 95°C 5 минут, цикл – 95°C –

Таблица 1. Специфические праймеры к генам сукцинатдегидрогеназы
Table 1. Specific primers for the genes of succinate dehydrogenase

Праймер	Прямой	Обратный
<i>sdha</i>	<i>cgcgatttctaccagttacc</i>	<i>aatgccatctccagttgtcc</i>
<i>sdhb</i>	<i>cgcttatecgtggatgatcg</i>	<i>tctcctttaggtcgccatc</i>

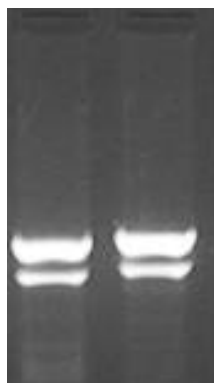


Рис. 2. Суммарная клеточная РНК, полученная с помощью набора PureLink®RNA MiniKit (Invitrogen, США) из клеток печени крыс
Fig. 2. Total cellular RNA obtained using the PureLink®RNA MiniKit (Invitrogen, USA) from the cells of rat livers

денатурация, 58°C – отжиг, 72°C – элонгация (детекция). Все фазы цикла длились 30 секунд. Финальная элонгация – 72°C длительностью 10 минут.

Обсуждение результатов

Суммарная РНК, выделенная из гепатоцитов крыс с помощью набора PureLink RNA MiniKit (Invitrogen, США), характеризовалась как высокоочищенный препарат, что подтверждается содержанием 28S рРНК примерно в три раза превышающим содержание 18S рРНК (рис. 2). Технология PureLink® сочетает в себе нетоксичный лизис с помощью гуанидинизотиоцианата с быстротой и качеством очистки на силикагельной мембране. Простая процедура выделения занимает менее 20 минут; обеспечивает высокий выход и не требует экстрагирования токсичными фенол/хлороформом, центрифугирования с CsCl или LiCl и осаждения спиртом.

Чистоту и качество нуклеиновых кис-

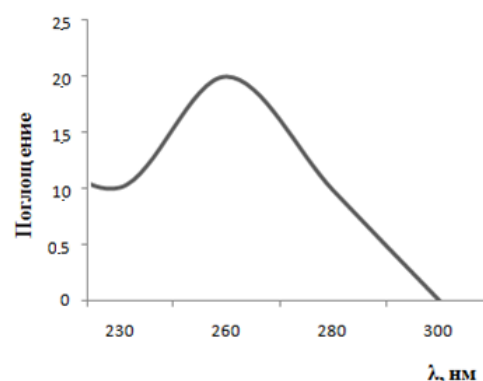


Рис. 3. УФ-спектр поглощения РНК
Fig. 3. UV-spectrum of the RNA absorption

лот оценивали спектрофотометрическим методом (рис. 3). Анализ полученной диаграммы показывает наличие одного пика при длине волны 260 нм, что соответствует спектру поглощения нуклеиновых кислот [12].

Чистоту образца рассчитывали, исходя из соотношения оптических плотностей A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} (таблица 2). Максимум поглощения для нуклеиновых кислот располагается при длине волны 260 нм, а для большинства белков – при 280 нм. Поглощение при длине волны 230 нм характерно для органических соединений и хаотропных солей, например, изотиоцианата гуанидина, который очень часто используют для выделения РНК. Для выделенного препарата РНК соотношение A_{260}/A_{280} составило 2.03, что характеризует его как высокоочищенный. Если значение менее – 1.8, то можно сказать, что исследуемый образец загрязнен полипептидами, а если более 2 – на возможную деградацию и наличие

Таблица 2. Чистота и выход РНК, полученной с помощью набора PureLink®RNA MiniKit (Invitrogen, США) из клеток печени крыс

Table 2. The purity and yield of RNA obtained using the PureLink®RNA MiniKit (Invitrogen, USA) from the cells of rat livers

Выход РНК (мкг/г ткани)	Коэффициент поглощения (A_{260}/A_{280})	Коэффициент поглощения (A_{260}/A_{230})
70±10.4	2.03±0.01	1.98±0.03

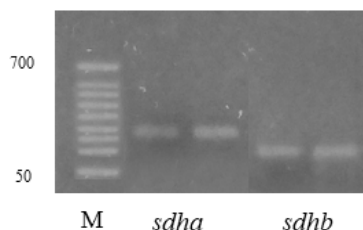


Рис. 4. ПЦР-продукты с ген-специфическими праймерами для генов *sdha* и *sdhb* сукцинатдегидрогеназы крыс. М – маркеры ДНК с известной длиной нуклеотидной последовательности

Fig. 4. PCR products with gene-specific primers for the *sdha* and *sdhb* genes of succinate dehydrogenase in rats. M – DNA markers with a known length of nucleotide sequence

свободных нуклеотидов [13].

РНК, полученную в ходе выделения, применяли для получения комплементарной ДНК, путём проведения реакции обратной транскрипции. ПЦР-анализ кДНК с подобранными ген-специфическими праймерами и последующий электрофорез продуктов реакции в 2% агарозном геле показал наличие одной полосы на фореграмме, что свидетельствует об их специфичности [14]. Для определения размеров полученных ПЦР-продуктов проводили сравнение амплификонов с маркерами длин ДНК. Ампликон гена *sdha* имел размер порядка 221 п.н., а ПЦР-продукт гена *sdhb* составлял 185 п.н. (рис.4).

В связи с тем, что результаты анализа ампликонов исследуемых генов совпадают с теоретическими расчётами, мы можем утверждать, что разработанные нами праймеры являются специфичными для генов *sdha* и *sdhb*, а, следовательно, могут быть использованы для идентификации сукцинатдегидрогеназы.

Заключение

Таким образом, использование набора PureLink®RNA MiniKit (Invitrogen,

США) позволило получить препарат суммарной РНК практически без следов деградации, что подтверждается содержанием 28S рРНК примерно в три раза превышающим содержание 18S рРНК. Технология PureLink® обеспечивает высокий выход РНК и не требует экстрагирования токсичными фенол/хлороформом, центрифугирования с CsCl или LiCl и осаждения спиртом, т.е. использования веществ, являющихся ингибиторами ПЦР. Кроме того, в связи с малой смесью наконечников и эппендорфов, возможность контаминации значительно сокращена. Следовательно, РНК, экстрагированная данным методом, может быть использована для дальнейших ферментативных реакций. Последующее проведение ПЦР-анализа показало, что подобранные нами праймеры являются специфичными и могут быть использованы в будущих исследованиях по определению скорости транскрипции генов *sdha* и *sdhb* сукцинатдегидрогеназы у крыс в норме и при различных патологиях.

Список литературы

1. Harwood A.J. // *Methods in Molecular Biology*. 1994. Vol. 58. pp. 3-7.
2. Григорьева Е.А., Неёлова О.В. // *Современные наукоемкие технологии*. 2014. № 7-2. p. 85.

3. Крисилова Е.В., Орос Г.Ю., Крисилов А.В., Селеменев В.Ф. // *Журнал физической химии*. 2014. Т. 88. № 4. С. 692-696.
4. Moss D., Harbison S.A., Saul D.J. // *Int. J. Legal Med.* 2003. Vol. 117. pp. 340-349.
5. Buckingham L., Flaws M.L. *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical*

Applications, F.A. Davis, Philadelphia, Pa, USA, 2007, 479 p.

6. Cseke L.J., Kaufman P.B., Podila G.K., Tsai C.-J. Hand book of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine – CRC Press, Boca Raton, Fla. USA. 2nd edition. 2004. 580 p.

7. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L. et al. // *J. Clin. Microbiol.* 1990. Vol. 28. No 3. pp. 495-503.

8. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла. Воронеж. Центрально-Черноземное книжное изд-во. 2005. 224 с.

9. Ву Т.Л., Селиванова Н.В., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2011. Т. 11. № 6. С. 900-904.

10. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В. Молекулярные аспекты формирования олигомерной структуры сукцинатдегидрогеназы. Воронеж. 2016. 264 с.

11. Bustin S.A. // *J Mol Endocrinol.* 2002. pp. 23-39. doi: 10.1677/jme.0.0290023.

12. Селеменев В.Ф. Пигменты пищевых производств (меланоидины). М. ДеЛи принт. 2008. 245 с.

13. Chen Q., Yu H.W., Wang X.R., Xie X.L. et al. // *Genet. Mol. Res.* 2012. Vol. 11. No 2. pp. 1773-1782. doi: 10.4238/2012.

14. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J. et al. // *Science.* 1988. Vol. 239. No 4839. pp. 487-91.

Isolation and identification of succinate dehydrogenase genes by membrane methods

© 2021 Selivanova N.V., Bakarev M.Yu., Eprintsev A.T.

Voronezh State University, Voronezh

The most important stage in the preparation of biological samples for biochemical and/or diagnostic processes is the isolation of nucleic acids from the sample. The choice of the method for RNA isolation depends, first of all, on the set tasks and a number of requirements. Among the key requirements are: the cost-effectiveness and simplicity of the method, a high yield of the isolated RNA, and a sufficient degree of purification of the final product. The purpose of this work was to identify succinate dehydrogenase genes in the cells of rat liver using a silica gel membrane to isolate total cellular RNA. The PureLink® RNA MiniKit (Invitrogen, USA) made it possible to obtain a preparation of total RNA practically with no traces of degradation, which was confirmed by the content of 28S rRNA that was approximately three times higher than the content of 18S rRNA. The PureLink® technology provided a high RNA yield. Another important advantage of the method was that it did not require extraction with toxic solvents (phenol/chloroform), centrifugation with CsCl or LiCl, or precipitation with alcohol, i.e. the use of substances that are PCR inhibitors. In addition, due to a rare change of tips and eppendorves, the possibility of contamination was significantly reduced, which was confirmed spectrophotometrically (the A_{260}/A_{280} ratio for the isolated RNA preparation was 2.03, and the A_{260}/A_{230} ratio was 1.98, which characterises the preparation as highly purified). Thus, an effective method was selected for the isolation of total cellular RNA without the impurities of extraneous nucleic acids. The pure RNA obtained as a result of isolation using a silica gel membrane was further used to obtain a complementary DNA. The cDNA obtained by the reverse transcription reaction method was subsequently used for a quantitative assessment of the content of gene transcripts encoding subunits A and B (*sdha* and *sdhb*) of succinate dehydrogenase. Further PCR analysis showed that the selected primers are specific and can be used in further studies to determine the transcription rate for the *sdha* and *sdhb* genes of succinate dehydrogenase in normal rats and in rats with various pathologies.

Keywords: succinate dehydrogenase, RNA, silica gel membrane, isolation of nucleic acids, electrophoresis.

References

1. Harwood A.J., *Methods in Molecular Biology*, 1994, Vol. 58, pp. 3-7.

2. Grigor'eva E.A., Nejolova O.V., *Sovremennye naukoemkie tehnologii*, 2014, No 7-2. p. 85.

3. Krisilova E.V., Oros G.Yu., Krisilov A.V., Selemenov V.F., *Zhurnal fizicheskoy khimii*, 2014, Vol. 88, No 4, pp. 692-696.

4. Moss D., Harbison S.A., Saul D.J., *Int. J. Legal Med.*, 2003, Vol. 117, pp. 340-349.

5. Buckingham L., Flaws M.L. *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical*

Applications, F.A. Davis, Philadelphia, Pa, USA, 2007, 479 p.

6. Cseke L.J., Kaufman P.B., Podila G.K., Tsai C.-J. Hand book of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine – CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2nd edition, 2004, 580 p.

7. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 1990, Vol. 28, No 3, pp. 495-503.

8. Eprincev A.T., Popov V.N., Shevchenko M.Yu. Jekspressija i regulacija fermentov gliksilatnogo cikla, Voronezh, Central'no-Chernozemnoe knizhnoe izd-vo, 2005, 224 p.

9. Vu T.L., Selivanova N.V., Eprincev A.T., Fedorin D.N., *Sorbtsionnye I khromatograficheskie protsessy*, 2011, Vol. 11, No 6, pp. 900-904.

Селиванова Наталия Владимировна – к.б.н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Бакарев Максим Юрьевич – старший лаборант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Епринцев Александр Трофимович – д.б.н., проф., зав. кафедрой биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

10. Eprincev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V. Molekuljarnye aspekty formirovanija oligomernoj struktury sukcinatdegidrogenazy, Voronezh, 2016, 264 p.

11. Bustin S.A., *J MolEndocrinol*, 2002, pp. 23-39. doi: 10.1677/jme.0.0290023.

12. Selemenev V.F. Pigmenty pishchevyh proizvodstv (melanoidiny), M., DeLi print, 2008. 245 p.

13. Chen Q., Yu H.W., Wang X.R., Xie X.L. et al., *Genet. Mol. Res.*, 2012, Vol. 11, No 2, pp. 1773-1782. doi: 10.4238/2012.

14. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J. et al., *Science*, 1988, Vol. 239, No 4839, pp.487-91.

Selivanova Natalia V. – Ph.D of Biology, doцент of Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: kir2202@yandex.ru

Bakarev Maxim Yu. – Senior Laboratory Assistant of Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: max15111@mail.ru

Eprintsev Alexander T. – Doctor of Biology, head of Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: bc366@bio.vsu.ru