



УДК 631.811.98 75.117.2.577.2.08

© 2011

В. А. Циганкова, Я. В. Андрусевіч,
академік НАН України **Я. Б. Блюм**

Виділення з клітин рослин малих регуляторних si/miRNA з антинематодною активністю

Розроблено новий метод виділення препаратів малих регуляторних si/miRNA високої чистоти та проведено перевірку їх функціональної (сайленсової) активності в безклітинній системі білкового синтезу. Встановлено, що регулятор росту Радостим-супер значно підвищує стійкість рослин до нематод шляхом стимуляції синтезу si/miRNA.

В останні 15 років велика увага приділяється виділенню з клітин еукаріотів та визначенню біологічної ролі малих регуляторних si/miRNA, за відкриття яких вченим Andrew Fire та Craig Mello у 2006 р. було присуджено Нобелівську премію в галузі фізіології та медицини [1–3]. До цієї гетерогенної популяції низькомолекулярних RNA належать microRNA (miRNA) та siRNA (small interfering RNA). miRNA (завдовжки 21–22 нт) утворюються із “шпилькоподібних” первинних, подовжених транскриптів з одноланцюгових окремих геномних локусів шляхом двох раундів ендонуклеазного розщеплення за допомогою RNase-III аналогічних ферментів. Другий тип малих RNA — siRNA розміром 22–24 нт, які утворюються за допомогою рибонуклеази III-Dicer з дволанцюгових RNA попередників-dsRNA (double-stranded RNA), представлені транскриптами з обох ланцюгів dsRNA. Один ланцюг використовується для “сайленсіювання” mRNA, інший — для відтворення dsRNA за перебігом реакції полімеразного копіювання. Припускається, що siRNA є похідними від подовжених послідовностей, що повторюються, транспозонів й трансгенів. Встановлено, що si/miRNA близькі за структурою і функцією (характеризуються антисенсовою комплементарною структурою до mRNA) та відіграють двояку роль у рослин [1–8]: 1) разом із сайт-специфічними ендо- й екзонуклеазами, які є компонентами RISC комплексу (RNA-induced silencing complex), si/miRNA визначають період життя кожної з молекул mRNA, насамперед знищують шляхом блокування (сайленсінгу) трансляції аберантні та недосконалі за структурою mRNA, які можуть з’являтися помилково в клітинах; 2) виконують захисні (антипатогенні й антипаразитичні) функції.

В обох випадках ці біологічні ефекти досягаються шляхом зв’язування з комплементарною полінуклеотидною ланкою mRNA власних клітин або mRNA хвороботворних вірусів,

або mRNA паразитичних організмів, наприклад нематод. Але у випадках інфікування великої маси клітин у тканинах рослин шкідниками синтезується недостатньо молекул si/miRNA проти тих або інших паразитів і тому, відповідно, не досягається захисний ефект. Вчені пропонують два підходи підвищення кількості si/miRNA у відповідь на патогенез [1, 2, 5–7]: 1) методом введення у клітини додаткового числа копій генів si/miRNA шляхом генетичної трансформації; 2) активацією експресії власних клітинних генів синтезу si/miRNA якимись специфічними індукторами.

Раніше нами було отримано експериментальні дані в лабораторних і польових дослідах, які демонструють, що створений в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України разом із Державним підприємством “Міжвідомчий науково-технологічний центр “Агробіотех” НАН і МОН України” регулятор росту рослин Радостим-супер значно підсилює імунізаційні властивості рослин до широкого кола патогенів та паразитичних організмів.

Мета авторів даного повідомлення — з’ясувати можливості підвищення стійкості рослин за рахунок посилення синтезу si/miRNA цим регулятором. У досліджах використовували рослини цукрового буряка та ріпака, інфікованих цистоутворювальною коренепаразитуючою нематодою *Heterodera schachtii* та оброблених регулятором росту рослин Радостим-супер. Можливість індукції регулятором росту рослин синтезу si/miRNA з антинематодною активністю перевіряли за допомогою молекулярно-біологічних методів. Для цього насіння цукрового буряка та ріпака з високою схожістю пророщували у чашках Петрі на безнематодному водному середовищі (контроль) та із суспензією цист нематод, з яких у процесі інкубації при 23 °C з’являлись личинки (приблизно на 5–7 добу). У паралельних пробах додавали також регулятор росту Радостим-супер високої активності.

На сьогодні існує багато методів виділення si/miRNA з клітин рослин [9–12]. Однак більшість з них є трудомісткими і дорогими у вжитку. Тому, виходячи з багаторічного досвіду нашої роботи з нуклеїновими кислотами, нами розроблено оригінальний метод виділення si/miRNA, що складається з таких етапів:

- 1) виділення сумарного препарату RNA з клітин рослин [13–15];
- 2) розділення poly(A)⁺RNA (тобто mRNA) та poly(A)⁻RNA на оліго(dT)-целюлозній колонці з метою подальшого використання poly(A)⁺RNA для тестування функціональної активності si/miRNA у безклітинних системах білкового синтезу;
- 3) осадження високомолекулярної poly(A)⁻RNA з елюату за допомогою 10%-го розчину поліетиленгліколю (ММ 8000) з 0,5 моль/л NaCl, а si/miRNA — рівним об’ємом 96%-го етанолу при -22 °C впродовж доби;
- 4) осадження poly(A)⁺RNA після елюції з колонки етанолом;
- 5) молекулярна гібридизація в розчині низькомолекулярних si/miRNA з фракцією poly(A)⁺RNA;
- 6) температурна денатурація (95 °C) гібридних молекул poly(A)⁺RNA з si/miRNA та відокремлення poly(A)⁺RNA від si/miRNA на оліго(dT)-целюлозній колонці;
- 7) повторне осадження si/miRNA 96%-м етанолом, перевірка чистоти виділених si/miRNA за допомогою електрофорезу у 15%-му поліакриламідному гелі (ПААГ-електрофорез) та сайленсової активності si/miRNA у безклітинних системах білкового синтезу з проростків пшениці.

Для дослідів по гібридизації si/miRNA з mRNA перед отриманням si/miRNA її інтенсивно мітили *in vivo* за допомогою Na₂HP³³O₄ [14]. Для дослідів по перевірці її інгібіруючої активності у безклітинних системах білкового синтезу з проростків пшениці використовували

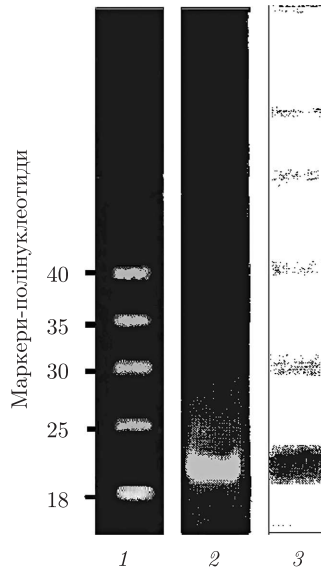


Рис. 1. ПААГ-електрофорез si/miRNA з проростків ріпака. Маркерні полінуклеотиди (в цифрах наведено довжину в нуклеотидах) та препарат si/miRNA на доріжках гелю (відповідно 1 й 2) були насичені етидіум бромідом; радіоавтограф ^{33}P мічених si/miRNA з гелю (доріжка 3)

ли немічену si/miRNA [15]. Дисперсійний статистичний аналіз даних проводили за Стьюдентом.

За результатами ПААГ-електрофорезу (рис. 1), нами отримано препарати si/miRNA високої чистоти розміром від 21 до 25 нуклеотидів, що відповідає класичним параметрам цих типів RNA.

В табл. 1 наведено дані стосовно рівня синтезу si/miRNA у рослин у контролі, в дослідках з рослинами, обробленими регулятором росту Радостим-супер, у рослин при інкубації з нематодами, а також у рослин в умовах дії регулятора росту Радостим-супер на фоні інфікування нематодами. Як свідчать отримані результати, під впливом регулятора росту Радостим-супер різко підвищується синтез клітинних si/miRNA, а інфікування рослин нематодами, навпаки, різко знижує синтез цього класу RNA. Стимулятор росту Радостим-су-

Таблиця 1. Вплив регулятора росту Радостим-супер на включення $\text{Na}_2\text{HP}^{33}\text{O}_4$ у si/miRNA в клітинах 5-добових проростків цукрового буряка, інкубованих і неінкубованих з нематодами

Варіанти дослідів	si/miRNA, імп/хв/мг
Контроль (проростки рослин, що інкубовані на водному середовищі)	2680 ± 98,0
Проростки, що отримані на водному середовищі з Радостим-супер	(4309 ± 121)*
Проростки, що вирощені на водному середовищі з личинками нематод	(1970 ± 83)*
Проростки, що вирощені на водному середовищі з Радостим-супер і личинками нематод	(3760 ± 112)*

Примітка. 5-добові проростки рослин інкубували з $\text{Na}_2\text{HP}^{33}\text{O}_4$ впродовж 1 год у чашках Петрі. Регуляторні si/miRNA — антисенсові, комплементарні до mRNA, виділяли за розробленою нами методикою отримання високоочищених нативних препаратів si/miRNA. Аліквоти радіоактивних si/miRNA вміщували на нітроцелюлозні основи з подальшим підрахунком радіоактивності.

*Наявність відмін від контролю, $p < 0,05$, $n = 3$.

пер дещо вирівнює синтез si/miRNA, але цей рівень, хоча й вище показника контролю, але не досягає рівня синтезу, індукованого регулятором росту без нематод.

У табл. 2 наведено дані, які розкривають суть результатів, наведених у табл. 1. Це, як можна бачити, пов'язано з тим, що нематодна інфекція знижує синтез власне клітинних si/miRNA, який значно підвищується при стимуляції регулятором росту та розвитку рослин Радостим-супер. Але цей прискорений синтез пригнічується личинками і в той самий час підсилюється синтез захисних антинематодних si/miRNA з комплементарною структурою до mRNA нематод (тобто здійснюється перепрограмування геному клітин рослин).

Аналогічні результати було отримано в наших дослідах і з рослинами ріпака при інфікуванні їх личинками нематод (табл. 3). Відомо, що той самий вид нематод, який вражає рослини буряка, вражає й ріпак (у ентомологів існує припущення, що спалах нематодної

Таблиця 2. Посилення антинематодних властивостей si/miRNA 5-добових проростків цукрового буряка під впливом регулятора росту Радостим-супер і личинок нематод

Варіанти дослідів	Ступінь гомології по гібридизації mRNA з P ³³ si/miRNA, імп/хв/20 мкг mRNA	Показник інгібування білкового синтезу в безклітинній системі, імп/хв/мг білка*	
		mRNA з рослин + P ³³ si/miRNA з рослин	mRNA з личинок + P ³³ si/miRNA з рослин
Гібриди mRNA з P ³³ si/miRNA контрольних рослин	8724 ± 146 (100%)	100%	10%
Гібриди mRNA контрольних рослин з P ³³ si/miRNA рослин, оброблених Радостим-супер	6850 ± 224 (83%)**	82%	15%
Гібриди mRNA контрольних рослин з P ³³ si/miRNA рослин, інкубованих з личинками нематод	6358 ± 182 (73%)**	65%	36%
Гібриди mRNA контрольних рослин з P ³³ si/miRNA рослин, інкубованих з Радостим-супер і личинками нематод	5583 ± 164 (64%)**	46%	58%

Примітка. Застосовано безклітинну систему білкового синтезу з проростків пшениці; за мічений попередник використовувалась амінокислота — S³⁵ метіонін.

*У безклітинній системі білкового синтезу застосовували ті самі варіанти дослідів, що й у дослідах по гібридизації.

**Наявність відмін від контролю, $p < 0,05$, $n = 3$.

Таблиця 3. Вплив регулятора росту Радостим-супер на включення Na₂HP³³O₄ у si/miRNA в клітинах 5-добових проростків ріпака, інкубованих і неінкубованих з нематодами

Варіанти дослідів	si/miRNA, імп/хв/мг
Контроль (проростки рослин, що інкубовані на водному середовищі)	4760 ± 146
Проростки, що отримані на водному середовищі з Радостим-супер	(6420 ± 208)*
Проростки, що вирощені на водному середовищі з личинками нематод	(2910 ± 117)*
Проростки, що вирощені на водному середовищі з Радостим-супер і личинками нематод	(5380 ± 185)*

Примітка. 5-добові проростки рослин інкубували з Na₂HP³³O₄ впродовж 1 год у чашках Петрі. Регуляторні si/miRNA — антисенсові, комплементарні до mRNA, виділяли за розробленою нами методикою отримання високоочищених нативних препаратів si/miRNA. Аліквоти радіоактивних si/miRNA вміщували на нітроцелюлозні основи з подальшим підрахунком радіоактивності.

*Наявність відмін від контролю, $p < 0,05$, $n = 3$.

епізоотії на рослинах буряка пов'язаний з привнесенням на поля масової нематодної популяції разом з ріпаком, що широко культивується в Україні).

Аналіз даних табл. 3 дає підставу говорити про ту саму закономірність у змінах синтезу si/miRNA у ріпака, яка спостерігається і у рослин буряка: значне підвищення рівня синтезу si/miRNA під впливом регулятора росту Радостим-супер; зниження рівня синтезу власних клітинних si/miRNA при інфікуванні рослин личинками нематод; зменшення ураження нематодами під впливом регулятора росту завдяки підвищенню рівня синтезу, очевидно, si/miRNA з антинематодною активністю.

Таким чином, у даній роботі вперше показано, що підвищення імунітету рослин проти нематодної інфекції досягається шляхом підсилення регулятором росту Радостим-супер синтезу малих регуляторних si/miRNA, споріднених (комплементарних) до структури mRNA нематод, що спричинює до блокування (сайленсінгу) трансляції mRNA нематод. Розроблений нами метод виділення si/miRNA можна використовувати для синтезу cDNA на матрицях si/miRNA та конструювання векторів на основі cDNA копій генів з експресією si/miRNA у трансформованих ними рослинах.

1. *Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T.* RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs // *Genes & Development.* – 2001. – **15**. – P. 188–200.
2. *Fuller V. L., Lilley C. J., Urwin P. E.* Nematode resistance // *New Phytologist.* – 2008. – **180**. – P. 27–44.
3. *Leung R. K. M., Whittaker P. A.* RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics // *Pharmacology and Therapeutics.* – 2005. – No 107. – P. 222–239.
4. *Aravin A., Tuschl T.* Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing // *FEBS Lett.* – 2005. – **579**. – P. 5830–5840.
5. *Bakhetia M., Charlton W. L., Urwin P. E.* RNA interference and plant parasitic nematodes // *Trends Plant Sci.* – 2005. – **10**, No 8. – P. 362–367.
6. *Gheysen G., Vanholme B.* RNAi from plants to nematodes // *Trends Biotechnol.* – 2006. – **25**, No 3. – P. 89–92.
7. *Knox D. P., Geldhof P., Visser A., Britton C.* RNA interference in parasitic nematodes of animals: a reality check? // *Trends Parasitol.* – 2007. – **23**, No 3. – P. 105–107.
8. *Jian X., Zhang L., Li G.* Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L // *Genomics.* – 2010. – **95**. – P. 47–55.
9. *Chen R., Hu Z., Zhang H.* Identification of microRNAs in wild soybean (*Glycine soja*) // *J. Integr. Plant Biol.* – 2009. – **51**, No 12. – P. 1071–1079.
10. *Bakhetia M., Charlton W. L., Urwin P. E.* RNA interference and plant parasitic nematodes // *Trends Plant Sci.* – 2005. – **10**, No 8. – P. 362–367.
11. *Lu C., Meyers B. C., Green P. G.* Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing // *Methods.* – 2007. – **43**. – P. 110–117.
12. *Yoo B. C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E. et al.* A systemic small RNA signaling system in plants // *Plant Cell.* – 2004. – **16**. – P. 1979. – 2000.
13. *Tsygankova V. A., Blume Ya. B.* An unusual minor protein appearing in embryonic axis cells of haricot bean seeds following germination process stimulated by 6-methylthiouracil // *Biopolymers and Cell.* – 1998. – **14**, No 5. – P. 438–448.
14. *Tsygankova V. A.* Concerning the peculiarities of gene expression changes in plant leaf cells during twenty-four-hour period // *Біотехнологія.* – 2010. – **3**, № 4. – С. 86–95.
15. *Цыганкова В. А., Мусатенко Л. И., Пономаренко С. П. и др.* Изменение популяций функционально активных цитоплазматических мРНК в клетках растений под влиянием регуляторов роста и биотехнологические перспективы бесклеточных систем белкового синтеза // *Там само.* – 2010. – **3**, № 2. – С. 19–32.

Інститут біоорганічної хімії
та нафтохімії НАН України, Київ
Інститут харчової біотехнології
та геноміки НАН України, Київ

Надійшло до редакції 02.03.2011

V. A. Tsygankova, Ya. V. Andrusevich,
Academician of the NAS of Ukraine **Ya. B. Blume**

**Isolation of small regulatory si/miRNA with antinematode activity
from plant cells**

A new method of small regulatory si/miRNAs' isolation is elaborated, and their functional (silence) activity in a cell-free system of protein synthesis is testified. It is found that the plant growth regulator Radostim-super enhances the plant resistance against nematode by stimulating the synthesis of si/miRNAs.