

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА DREB2A ИЗ РАСТЕНИЯ HALOCNEMUM STROBILACEUM (Pall.) Bieb. M.

Ризаев Д.М.,

*Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова Академии наук Республики Узбекистан,
младший научный сотрудник*

Зиявутдинов Ж.Ф.,

*Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова Академии наук Республики Узбекистан,
профессор д.х.н.*

Шеримбетов С.Г.,

*Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова Академии наук Республики Узбекистан,
профессор д.б.н.*

Адилов Б.Ш.,

*Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии наук Республики Узбекистан
ведущий научный сотрудник д.б.н.*

Курганов С.К.,

*Институт биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана имени Мирзо
Улугбека, старший научный сотрудник к.м.н.*

Пулатов О.Р.

*Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр кардиологии врач
генетик*

ISOLATION AND DETERMINATION OF THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE DREB2A GENE FROM THE PLANT HALOCNEMUM STROBILACEUM (Pall.) Bieb. M.

Rizaev D.

Institute of Bioorganic Chemistry named after academician A.S. Sadykov Uzbekistan, Junior Researcher

Ziyavutdinov J.

*Institute of Bioorganic Chemistry named after. acad.
A.S. Sadykov of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Professor Doctor of Chemical Sciences*

Sherimbetov S.

*Institute of Bioorganic Chemistry named after. acad.
A.S. Sadykov of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Professor Doctor of Biology Sciences*

Adilov B.

*Institute of Genetics and Experimental Plant Biology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan
leading researcher, Doctor of Biology Sciences*

Kurganov S.

*Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
Senior Researcher, PhD*

Pulatov O.

Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Cardiology, Geneticist, PhD

АННОТАЦИЯ

Белок гена DREB2A отвечает за устойчивость к засухе и высокотемпературным стрессам, и является одним из факторов транскрипции. Ген DREB2A активирует гены, которые экспрессируются в условиях засухи и стресса при высоких температурах. С целью исследования природную суть данного молекулярно-биологического процесса, из генома растения *Halocnemum strobilaceum* (Pall.) Bieb. M. был выделен ген DREB2A, состоящий из 1231 пар нуклеотидов и анализирован с помощью биоинформатического метода.

ABSTRACT

The DREB2A gene protein is responsible for resistance to drought and high-temperature stress, and is one of the transcription factors. The DREB2A gene activates genes that are expressed under drought and high-temperature stress conditions. In order to study the natural essence of this molecular biological process, the DREB2A gene, consisting of 1231 nucleotide pairs, was isolated from the genome of the *Halocnemum strobilaceum* (Pall.) Bieb. M. plant and analyzed using the bioinformatics method.

Ключевые слова: DREB2A, *Halocnemum strobilaceum* (Pall.) Bieb. M., фактор транскрипции, ген, праймер, стресс засухи.

Keywords: DREB2A, *Halocnemum strobilaceum* (Pall.) Bieb. M., transcription factor, gene, primer, drought stress.

Абиотические стрессы, такие как засуха, высокая соленость и низкие температуры, являются распространенными неблагоприятными условиями окружающей среды, которые значительно влияют на рост и продуктивность растений во всем мире. Толерантность растений к этим стрессам носит комплексный характер, то есть представляет собой результат взаимодействия множества генов и биохимических факторов.

На молекулярном уровне масштабный анализ транскриптома показал, что продукты этих генов можно в целом разделить на две группы [1]. Первая группа состоит из генов, которые кодируют белки, обеспечивающие защиту клеток от водного стресса. Эти гены управляют накоплением совместимых растворимых веществ – ключевых ферментов для биосинтеза осмолитов, таких как пролин, бетаин, сахара и т. д.; пассивным транспортом через мембраны и энергозатратными водными транспортными системами – белками водных каналов и мембранными транспортерами; а также защитой и стабилизацией клеточных структур от высыхания и повреждения активными формами кислорода с помощью ферментов детоксикации – глутатион-S-трансфераза, каталаза, супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза и др.; ферментами, участвующими в метаболизме жирных кислот, ингибиторами протеиназ, ферритином и белками-переносчиками липидов. Помимо этого, они кодируют белки – LEA, осмотин, антифризные белки, шапероны и др. для защиты макромолекул.

Вторая группа генов, активируемых абиотическими стрессами, включает регуляторные белки, которые дополнительно регулируют передачу стрессовых сигналов и модулируют экспрессию генов, вероятно, участвуя в ответе на стресс. К ним относятся различные факторы транскрипции, такие как онкоген миелоцитоматоза (MYC), онкоген миелобластоза (MYB), основная лейциновая молния (bZIP), NAM, ATAF и CUC (NAC), связывающие элементы, чувствительные к дегидратации (DREB) и др., что указывает на роль различных механизмов регуляции транскрипции в путях передачи стрессовых сигналов; протеинкиназы, такие как киназа митоген-активируемого белка (MAP), киназа кальций-зависимого белка (CDP), рецепторная протеинкиназа и др.; протеинфосфатазы и протеиназы, включая фосфоэстеразы и фосфолипазу C, участвующие в регуляции передачи сигналов и экспрессии генов [2, 3].

Транскрипционные факторы взаимодействуют с цис-элементами в промоторных областях различных генов, связанных со стрессом, для повышения экспрессии многих нижестоящих генов, тем самым обеспечивая устойчивость к стрессу [4]. Ключевую роль в устойчивости растений играют различные транскрипционные факторы [5, 6]. Среди них выделяется группа DREB (Dehydration-Responsive Element Binding) из семейства AP2/ERF белков. Транскрипционные факторы DREB в ответ на абиотический стресс индуцируют экспрессию множества генов, связанных с зависимым от абсцизовой

кислоты (АБК) и АБК-независимым путем передачи сигнала [7]. Транскрипционные факторы DREB специфически связывается с регуляторной последовательностью Dre (5'-TACCGACAT-3'), которую впервые выявили в промоторе гена *rd29A* [8]. Белок DREB содержит щелочной N-концевой аминокислотный участок, действующий как сигнал ядерной локализации. Справа от N-концевого участка расположен ДНК-связывающий домен AP2, который состоит из трехцепочечных β -складчатостей и одной α -спирали, почти параллельной β -складчатости [9]. Ключевыми для связывания с GCC-боксом ДНК служат семь остатков аминокислот в AP2 домене. К ДНК-связывающему домену AP2/ERF прилегает консервативный участок с высоким содержанием серина и треонина, который может служить сайтом фосфорилирования. У DREB имеется кислый C-концевой участок, который, как предполагают [10], обладает транскрипционной активационной активностью.

В связи с высоким уровнем стрессовых факторов, в качестве объекта исследования нами были выбраны гипергалофитные растения семейства *Amaranthaceae* (Амарантовые), произрастающие на высохшем дне Аральского моря. Из-за чрезвычайно высокого содержания солей (15-25, иногда 35 процентов) и высокого уровня минерализации грунтовых вод в типичных солончаках возникли сложные условия для произрастания диких растений [11]. Изучение транскрипционных факторов растений, приспособленных к росту в таких стрессовых условиях, и перенос этих факторов в лекарственные растения, а также, исходя из современных требований, применение этих видов растений для предотвращения миграции песчаных дюн и пыльных бурь является одной из актуальных проблем регионов, переживающих экологический кризис. Одним из таких перспективных растений является *Halocnemum strobilaceum*, распространенное на Южном Аралкуме.

H. strobilaceum небольшой серый кустарник или полукустарник плотно растущее, разветвленное и в основном с укоренившимися ветвями растения, является соленакапливающим галофитом. Распространен в Европе, Кавказе, Западной Сибири, Малой Азии, Иране, Афганистане, Аравийском полуострове, Северной Африке, Средней Азии (Республика Каракалпакстан, Нижняя Амударья, Кызылкум, Устюрт, Аралкум) [12]. Включен в Красную книгу [13, 14].

На рост и развитие растений негативно влияют абиотические стрессовые факторы - засуха, низкие температуры и засоленность почвы. В естественных условиях *H. strobilaceum* очень устойчиво к засолению, выживая в почве, покрытой 5-10 см коркой с обильным содержанием соли. Более того, оно может произрастать в почве с общим содержанием солей 38% в слое почвы с глубиной 0-10 см и 29% с глубиной 10-30 см [15].

Цель исследования – получение и определение нуклеотидной последовательности полного гена DREB2A из растения *H. strobilaceum* семей-

ства *Amaranthaceae*, создание дизайна нового праймера, определение полиморфизма с помощью биоинформатических онлайн программ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали биоматериалы растения *H. strobilaceum*, собранные в Южном Аралкуме в 2021 г. Вид растения идентифицирован сотрудниками Института ботаники АН РУз.

Общая ДНК из листьев из растения выделена с использованием набора Pure Link Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific).

Дизайн праймеров

Для проведения амплификации гена DREB2A из растений семейства *Amaranthaceae* был проведен поиск нуклеотидной последовательности гена

DREB2A из базы данных NCBI (NCBI-www.ncbi.nlm.nih.gov) с помощью алгоритма BLASTN веб-приложения BLAST в базе данных GenBank. С использованием нуклеотидных последовательностей гена DREB2A растений *Salicornia brachiata* (ID:GU809211.1), *Haloxylon ammodendron* (ID:KP765243.1), *Beta vulgaris* (ID:XM_010694618.3), *Chenopodium quinoa* (ID:XM_021876866.1) для обратного праймера и *Chenopodium album* (ID:OX_419225.1) и *Salicornia ramosissima* (ID:OX_596239.1) для прямого праймера из базы данных NCBI, создан дизайн специальных дегенеративных праймеров для амплификации приблизительно 1500 пар нуклеотидных последовательностей на базе программы CLUSTAL O (1.2.4) Multiple Sequence Alignment (табл.).

Таблица

Олигонуклеотидная последовательность праймеров для амплификации гена DREB2A для растение *H. strobilaceum*

Праймеры	5'-3' Олигонуклеотидная последовательность
Pr_Dr_F1	GGGAWRTTTTAWAWWTTKATTTA
Pr-DOST_R1	AAACCTAYWGAGAATAAGCTT

Полимеразная цепная реакция

Амплификацию участков гена DREB2A исследуемого галофитного растения *H. strobilaceum* проводили в амплификаторе MiniAmp™ Plus Thermal Cycler (Applied BioSystems, США) с помощью специальных праймеров. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) гена DREB2A проводили по протоколу

из набора Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher SCIENTIFIC, USA).

Для количественного определения нуклеотидов в продукте ПЦР проводили электрофорез в 2% агарозном геле. Длину продукта ПЦР определяли с помощью ДНК-маркера 100bp DNA Ladder (Invitrogen, USA) (рис. 1).

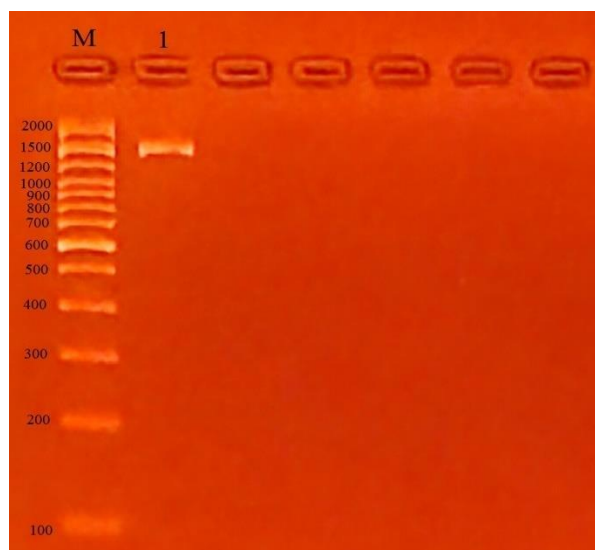


Рисунок 1. Электрофореграмма ПЦР продукта гена DREB2A
M - DNA marker; 1. *H. strobilaceum*

Секвенирование и анализ данных

Очистку продукта ПЦР от не связанных праймеров, dNTP и солей в процессе амплификации проводили с помощью набора PureLink Quik Gel Extraction Kit (Invitrogen, США). Секвенирование проводили по методу Сэнгера с помощью набора BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA). Определение нуклеотидной последовательности проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, США).

Выравнивание последовательностей: для редактирования полученных необработанных данных использовалась программа Snap Gene 5.3.1. из системы анализа последовательности ДНК. Нуклеотидные последовательности исследовали с использованием программы BLASTN (инструмент поиска базового локального выравнивания нуклеотид-нуклеотид, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях [16], нами секвенирован фрагмент гена DREB2A растения *H. strobilaceum*, состоящего из 904 пар нуклеотидов. А в данном исследовании использовали новый праймер типа *forward* (направленный вперед) для амплификации полного гена DREB2A растения *H. strobilaceum*. Установлено, что в ПЦР продукте растения *H. strobilaceum* содержатся около 1500 пар нуклеотидов (рис. 1). Мы обратили внимание на то, что результаты амплификации гена DREB2A со специальным дизайном соответствуют нуклеотидной последовательности из 1500 пар оснований. Далее проводили секвенирование полученного продукта ПЦР. В результате нами определена следующая последовательность из *H. strobilaceum* – 1231 пар нуклеотидов.

Нуклеотидная последовательность гена DREB2A растения *H. strobilaceum*:

TTAAGAGGTGTAGTGGTTGCTGAGATACA
GCCTCATAAATTAACTCAGTTTTCCTTTAATT
TGCCAGGATGGCACTTTCGATTACAACGAAG
CTTCTTCTAACCAACCTTCTTCTTCTATACCT
TTGATTACACCAGGAAGAGGAAGTCTCGGAG
AAGGCGTAATGGAAGTGAATCAGTTGAAGAA
ACTCTTGCTAAATGGAAGAAATCAATAGTAC
CCCATATCCAAATAATGGAGGCAAGCCTGTTA
GAAAGGCACCTGCAAAAGGTTCTGAAGAAGGG
ATGTATGAAAGGAAAAGGTGGGCCAGAGAAT
TCTCTTTGTAAATTTGAGGAGTTAGACAGAG
GACCTGGGGTAAATGGGTTGCTGAAATTCGA
GAGCCGAACAGGGGTAGAAGACTTTGGCTCG
GTACTTTCCCACTGCCCTTGAAGCTGCATTG
GCTTATGACGAGGCTGCTCGTACTATGTATGG
TCCAAGTGCTCGGTAAACTTACCAATCACC
CTTCATCATTTGTTGAGGAGATTGTAGAATATC
GCTGCTGCTAGGCCTGCTACTACTGCATCATA
TACAACAGCTTCTACGTCTTCTGATGGTCATT
CTGAAGTGTGTGTAAGATGAGCCAGACTCT
ACAATGAGCGGTCCTGCTTTGAAGTGGGAAG
AGGGTGAAGGAGAGTCAAAGGCCAATTTTAG
TACTGCTTCCATGGATTTAACTCTGGCCACC

CACCTACTGCCATTAAGGAAGAAGCAATGAC
AGAAGCTTGTAGGGGTGAAGATGGCATCGAC
ATCAATGATTATTTGCAGAACCTAACAATGGA
TGAAATGTTTGATRTTGATGAATTACTCGGAG
CTATAAATGCTGGTCCTGTTCCCCCTGCAGAT
TATATAATGAACCAAGGTTATGAAGATTTTAG
ATCCCAAGTCGAGGGAAACCAAATACAGCTG
GAGCAGCCTGARGATCTGCCACAACAGAACC
TGAATTCCAATTTCTGTATTCTGTACATAATC
AGGACAATGCTAAGCTGCCTGGAAGTTTGCAT
GGCACTGATCAAAGTCATAATGGTTCTGATGA
CGGGTTTGATTTCTTAAAGCCGGGTGCGACAAG
AAGATTATAATTTAGCTGTTGATGATCATGGT
TTTCTGGATCTTGCAGAACTCGAGATGTAAACA
AGCTCAACGCGGGAGTGGATATACACAATTA
GTCTGAATTATGTTGGAACATTTCCGGAG

Примечание: выделенный зеленым цветом фрагмент – инициационный и терминационный триплеты.

Анализ BLAST в базе данных NCBI показал, что исследуемая последовательность принадлежит фактору транскрипции DREB2A. Результат BLAST-анализа изолята HsDREB2A из Узбекистана на базе данных нуклеотидных последовательностей показал, что данный ген похож на другие DREB2A из растений *Salicornia brachiata* (ID: GU_592205.1), *Beta vulgaris* subsp. (ID: XM_019252283.3), *Haloxylon ammodendron* (ID: PP_236848.1), *Haloxylon ammodendron* (ID: KP_765243.1), *Chenopodium quinoa* (ID: XM_021876863.1) на 89, 86, 80, 80, 78% соответственно. А также, подтверждено, что фрагмент ДНК, выделенный из *H. strobilaceum* представляет собой нуклеотидную последовательность гена DREB2A. Для сравнения аминокислотной последовательности мы выбрали самые схожие изоляты *Salicornia brachiata* (ID: ADD92167.1), *Beta vulgaris* subsp. (ID: XP_019107828.1) и *Chenopodium quinoa* (ID: XP_021732555.1). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей было выполнено с помощью Clustal W (см. рис. 2).

4. Agarwal P. K., Jha B. // Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling // *Biologia Plantarum*, 2010, vol. 54 P. 201-212
5. Chen W.J., Zhu T. // Networks of transcription factors with roles in environmental stress re-sponse // *Trends Plant Sci.*, 2004, 9(12): P. 591-596
6. Xu Z.S., Chen M., Li L.C., Ma Y.Z. // Functions of the ERF transcription factor family in plants. *Botany*, 2008, 86(9): P. 969-977
7. Wang J.W., Yang F.P., Chen X.Q., Liang R.Q., Zhang L.Q., Geng D.M., Zhang X.D., Song Y.Z., Zhang G.S. // Induced expression of DREB transcriptional factor and study on its physiological effects of drought tolerance in transgenic wheat // *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(5): P. 468-476
8. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K // A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress // *The Plant Cell Online*, 1994, 6(2): P. 251-264
9. Magnani E., Sjölander K., Hake S. // From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants // *Plant Cell*, 2004, 16(9): P. 2265-2277
10. Почтовый А. А., Крупин П. Ю., Дивашук М. Г., Кочешкова А. А., Соколов П. А., Карлов Г. И. // 2018 г. Клонирование гена DREB1 и создание его ДНК-маркера, дифференцирующего DREB1 мягкой пшеницы и ее дикорастущих сородичей // *Сельскохозяйственная биология*, 2018, том 53, № 3, стр. 499-510.
11. Dukhovny V., Stulina G., Eshchanov O., Kenjabaev Sh., Zaitov Sh., Ruziev I., Kurbanova K., Ganiev M., Idirisov K., Sherimbetov S., Abdirakhimova S., Esenbaev G., Kojenkova I., Norkulova M., Löw F. // Monitoring the Dried Seabed of The Aral Sea. Joint UNDP and UNESCO Programme. 2021, P. 133-152.
12. Зенкина Т. Е. // Пространственная и демографическая структура ценопопуляций Сарсазана шишковатого (*Halocnemum strobilaceum* (Pall.) Bieb., *Chenopodiaceae*) в Республике Калмыкии // *Вестник ВолГУ. Серия 11, Естественные науки.* – 2012. № 1 (3). стр. 10–17.
13. Бекишева И. В., Самойлова Г. В. Сарсазан шишковатый *Halocnemum strobilaceum* (Pall.) Bieb. // *Красная книга Омской области.* Омск: ОмГПУ, 2005. стр. 305
14. Красная книга Новосибирской области: Животные, растения и грибы. Новосибирск: Арта, 2008. стр. 527.
15. Xiao-Xia Qu, Zhen-Ying Huang, Jerry M. Baskin, Carol C. Baskin // Effect of Temperature, Light and Salinity on Seed Germination and Radicle Growth of the Geographically Widespread Halophyte Shrub *Halocnemum strobilaceum* // *Annals of Botany*, № 101: 2008 y. P. 293–299
16. Д. М. Ризаев, Ж. Ф. Зиявитдинов, С. Г. Шеримбетов, Б. Ш. Адилов, С. К. Курганов, О. Р. Пулатов // Фактор транскрипции DREB2A гипергалофита растений произрастающего в приаралье // *Узбекский Биологический журнал* № 4-2023 г. стр. 31-36.