

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕСТОПОЛОЖЕНИЯ НУКЛЕОТИДА, С КОТОРОГО НАЧИНАЕТСЯ ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОВ ТУБУЛИНА ИНФУЗОРИИ *STYLONYCHIA LEMNAE*

© А. Ю. Пименов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: iamshura@yahoo.com

В современной литературе, посвященной изучению регуляции транскрипции, наблюдаются существенные разногласия относительно точного местоположения нуклеотидов, с которых начинается транскрипция генов тубулина брюхоресничных инфузорий. Причиной этих разногласий является различие методик, используемых исследователями. В настоящей работе проанализированы основные методы определения местоположения нуклеотидов, с которых начинается транскрипция генов тубулина брюхоресничной инфузории *Styloynchia lemnae*. Предложена модификация метода определения местоположения нуклеотидов, с которых начинается транскрипция, основанного на совместном анализе продуктов секвенирования ДНК и обратной транскрипции мРНК на одном полиакриламидном (ПАА) геле. В случае использования в реакции секвенирования нефосфорилированных праймеров, что рекомендуется стандартным протоколом, фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования ДНК, обладают меньшей электрофоретической подвижностью, чем фрагменты ДНК, имеющие такую же длину, полученные в результате обратной транскрипции мРНК. Различие электрофоретической подвижности у фрагментов ДНК одного размера отчетливо заметно на электрофореграммах ПАА-гелей. После проведения электрофореза электрофоретические полосы, содержащие фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования ДНК, находятся на меньшем расстоянии от старта электрофореза, чем фрагменты ДНК, имеющие такую же длину, полученные в результате обратной транскрипции мРНК, что затрудняет однозначную интерпретацию результата, приводя к возможным ошибкам в оценке данных. Таких различий в электрофоретической подвижности можно избежать, используя при секвенировании праймеры, фосфорилированные нерадиоактивным фосфором. В настоящей работе с использованием указанного метода было переопределено местоположение нуклеотидов, с которых начинается транскрипция генов  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -тубулина инфузории *S. lemnae*.

**Ключевые слова:** точка начала транскрипции, секвенирование, обратная транскрипция, гены тубулина, инфузории.

**Принятые сокращения:** ПАА-гель — полиакриламидный гель, ПНК — полинуклеотидкиназа.

При исследовании регуляции транскрипции в различных генах инфузорий немаловажную роль играет изучение местоположения нуклеотидного состава и функций специфических регуляторных участков ДНК, необходимых для взаимодействия с ферментом РНК-полимеразой и различными белковыми факторами транскрипции. Специфические регуляторные последовательности ДНК, принимающие участие во взаимодействии с субъединицами РНК-полимеразы и белковыми транскрипционными факторами при образовании транскрипционного комплекса, располагаются в непосредственной близости от нуклеотидов, с которых начинаются транскрипция и трансляция гена (Пименов и др., 2006). Строгая пространственная ориентация регуляторных участков ДНК относительно транслируемой и транскрибуемой областей гена определяет необходимость экспериментального определения местоположения нуклеотидов, с которых начинаются транскрипция и трансляция гена (Пименов и др., 2006).

При определении местоположения нуклеотидов, с которых начинается транскрипция гена, широко используется секвенирование ДНК в сочетании с другими молеку-

лярно-биологическими методами (Conzelmann, Helftenbein, 1987; Steinbueck, 1990). Наибольшее распространение получила методика, суть которой заключается в анализе фрагментов ДНК, полученных в результате секвенирования и нуклеазного расщепления ДНК, с помощью электрофореза на одном ПАА-геле.

В результате работы фермента ДНК-полимеразы, синтезирующего молекулы ДНК с использованием секвенируемой ДНК гена в качестве матрицы, нуклеотидов и праймера, определяющего местоположение начала синтеза, происходит образование набора фрагментов исходной цепи ДНК, ограниченных с одной стороны специфическим праймером, а с другой — модифицированной формой одного из четырех нуклеотидов, присутствующих в реакционной смеси и определяющих терминацию синтеза ДНК (Sanger et al., 1977). Таким образом, в результате секвенирования образуется набор фрагментов исходной ДНК, различающихся по длине на один нуклеотид и соответственно обладающих разной электрофоретической подвижностью. По классической методике реакционная смесь секвенирования разделяется на четыре образца, в

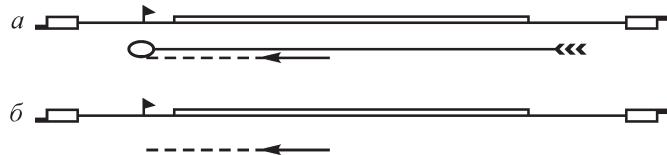


Рис. 1. Схема обратной транскрипции РНК.

Приведена схема мини-хромосомы макронуклеуса *Styloynchia lemnae*. Серый прямоугольник — кодирующая область гена, непрерывные линии — некодирующие фланкирующие участки, белые прямоугольники — тэломеры, флагжок — точка начала транскрипции. а — схема синтеза фрагментов ДНК в ходе обратной транскрипции мРНК гена; стрелка с концом в виде окружности — мРНК, штриховая линия — синтезируемая молекула ДНК, стрелка с острым концом — место отжига праймера и направление синтеза молекулы ДНК. б — схема синтеза фрагментов ДНК в ходе секвенирования ДНК гена; штриховая линия — один из фрагментов ДНК, синтезированный в ходе секвенирования ДНК мини-хромосомы, обрывающийся на нуклеотиде, с которого начинается транскрипция гена, стрелка с острым концом — место отжига праймера и направление синтеза молекулы ДНК.

каждом из которых присутствует один тип модифицированных нуклеотидов, определяющих терминацию синтеза цепи ДНК. В результате в каждом из образцов образуется набор фрагментов исходной ДНК, ограниченных с одной стороны специфическим праймером, а с другой — модифицированной формой определенного нуклеотида (Sanger et al., 1977). Такая постановка эксперимента позволяет при нанесении четырех образцов секвенирования на соседние дорожки ПАА-геля и последующем электрофорезе получать электрофорограмму, на которой фрагменты ДНК, различающиеся по длине на один нуклеотид, представлены в виде электрофоретических полос, находящихся на разном расстоянии от старта электрофореза, а вертикальная последовательность электрофоретических полос отражает нуклеотидную последовательность в соответствующем участке ДНК. Знание типа нуклеотида, на котором обрываются цепи фрагментов ДНК на каждой из четырех дорожек, дает возможность восстановить нуклеотидную последовательность секвенируемой ДНК гена.

Классическим способом определения местоположения нуклеотида, с которого начинается транскрипция генов в мини-хромосомах брюхоресничных инфузорий, является совместное использование секвенирования гена и метода S<sub>1</sub>-картирования (S<sub>1</sub> nuclease mapping), основанного на гибридизации меченых по 5'- или 3'-концу чаще всего одноцепочных фрагментов молекулы ДНК и тотальной РНК организма с последующим расщеплением одноцепочных молекул нуклеазой S<sub>1</sub> (Хеймс, Хиггенс, 1987; Conzelmann, Helftenbein, 1987; Helftenbein, Muller, 1988). Образующийся фрагмент ДНК ограничен с одной стороны определенным сайтом рестрикции, по которому осуществлялось его вырезание из мини-хромосомы, а с другой — нуклеотидом, с которого начинается синтез мРНК, что определяется присутствием молекулы мРНК в РНК—ДНК-комплексе. Сравнительный анализ таких продуктов нуклеазного расщепления ДНК и продуктов ее секвенирования после электрофореза тех и других на одном ПАА-геле, по мнению авторов, дает возможность говорить о местоположении нуклеотида, с которого начинается транскрипция в исследуемых генах. Действительно, при необходимом соответствии местоположения сайта рестрикции в S<sub>1</sub>-картировании и места отжига праймера для секвенирования фрагменты ДНК, полученные в результате нуклеазного расщепления РНК—ДНК-комплекса, должны иметь такую же длину и электрофоретическую подвижность, как и фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования и ограниченные нуклеотидом, с которого начинается транскрипция гена.

Таким образом, электрофоретическая полоса с фрагментами ДНК, полученными в результате секвенирования, находящаяся на электрофорограмме на том же расстоянии от старта электрофореза, что и электрофоретическая полоса с фрагментами ДНК, полученными в результате нуклеазного расщепления, определяет местоположение нуклеотида, с которого начинается транскрипция (Conzelmann, Helftenbein, 1987).

Однако в работах, посвященных изучению механизмов регуляции транскрипции генов α1-, α2-, β1- и β2-тубулина брюхоресничной инфузории *S. lemnae*, наблюдается противоречие данных о местоположении нуклеотида, с которого начинается синтез мРНК (Conzelmann, Helftenbein, 1987; Helftenbein, Muller, 1988; Helftenbein et al., 1989; Steinbrueck, 1990). Так, при изучении регуляции транскрипции гена α1-тубулина *S. lemnae* в ранней работе нуклеотид, с которого начинается транскрипция, идентифицировался в положении 41 п. н. левее триплета ATG, с которого начинается трансляция гена (Helftenbein, Muller, 1988), а в более поздних работах — в положении 101 п. н. левее триплета ATG (Helftenbein et al., 1989; Steinbrueck, 1990). Сходная ситуация имеет место и в отношении регуляции транскрипции гена β2-тубулина *S. lemnae*. Здесь нуклеотид, с которого начинается транскрипция, одними авторами определяется в положении 39 п. н. левее триплета ATG, с которого начинается трансляция гена (Helftenbein et al., 1989), а другими — в положении 38 п. н. левее триплета ATG (Conzelmann, Helftenbein, 1987; Steinbrueck, 1990). Ясно, что такое несоответствие, ставящее под сомнение как результаты опытов, так и выводы, сделанные на их основе, свидетельствует о несовершенстве используемой методики.

При определении нуклеотида, с которого начинается синтез мРНК, рядом авторов применялась и другая методика — использование секвенирования ДНК исследуемого гена в сочетании с обратной транскрипцией соответствующей мРНК. В ходе обратной транскрипции на мРНК, синтезированной на исследуемом гене, отжигаются ДНК-праймеры, которые затем удлиняются при помощи фермента обратной транскриптазы с образованием комплементарных цепей ДНК (Sambrook et al., 1989) (рис. 1). При наращивании праймера по направлению к 3'-концу молекулы мРНК получаемый фрагмент ДНК обрывается на нуклеотиде, с которого начинается цепь мРНК, т. е. на нуклеотиде, с которого начинается транскрипция.

Использование одних и тех же праймеров для секвенирования гена и для обратной транскрипции мРНК приводит к тому, что стартовый нуклеотид для синтеза молекул ДНК в обеих реакциях оказывается одним и тем же, что обуславливает сопоставимость продуктов обеих реакций после их электрофореза на одном ПАА-геле. Действительно, фрагменты ДНК, полученные в результате обратной транскрипции мРНК, должны иметь такую же длину и электрофоретическую подвижность, как и фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования и ограниченные нуклеотидом, с которого начинается транскрипция гена. Таким образом, электрофоретическая полоса с фрагментами ДНК, полученными в результате секвенирования, находящаяся на электрофорограмме на том же расстоянии от старта электрофореза, что и электрофоретическая полоса с фрагментами ДНК, полученными в результате обратной транскрипции мРНК, определяет мес-

тотоположение нуклеотида, с которого начинается транскрипция.

Такая методика применялась при изучении как генов инфузорий рода *Euplotes* (Kaufmann, Klein, 1992; Ghosh et al., 1994; Bender, Klein, 1997), так и генов тубулина мини-хромосом *S. lemnae* (Skovorodkin et al., 1999). Интересно, что и в этих работах нет однозначного результата, позволяющего говорить о точном местоположении нуклеотида, с которого начинается синтез мРНК. Так, разрешающая способность метода в экспериментах по определению местоположения нуклеотида, с которого начинается транскрипция, в ряде генов *Euplotes* и, в частности, в гене  $\beta$ -тубулина не позволяет авторам локализовать нуклеотид, с которого начинается транскрипция, с необходимой точностью (Ghosh et al., 1994). В работе, выполненной на гене  $\alpha 1$ -тубулина *S. lemnae*, было показано, что нуклеотид, с которого начинается транскрипция, находится в положении 38 п. н. левее триплета ATG, с которого начинается трансляция гена (Skovorodkin et al., 1999), что также отличается от всех ранее опубликованных данных.

Можно предположить, что во всех рассмотренных работах анализ ПАА-гелей был затруднен тем, что фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования ДНК и обратной транскрипции мРНК и имеющие одинаковую длину и нуклеотидный состав, обладали разной электрофоретической подвижностью (Kaufmann, Klein, 1992; Ghosh et al., 1994; Bender, Klein, 1997; Skovorodkin et al., 1999).

Задачей настоящего исследования являлась разработка наиболее надежного метода определения местоположения нуклеотида, с которого начинается транскрипция, в различных генах инфузорий. С использованием этого метода было определено точное местоположение нуклеотидов, с которых начинается транскрипция генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина *S. lemnae*.

## Материал и методика

В работе использован клон инфузории *S. lemnae*, полученный в результате скрещивания двух клонов, один из которых был получен от инфузории, взятой из водоема в г. Дорум в Северной Германии (Dorum, Germany), другой — от инфузории, взятой из водоема в Петергофе под Санкт-Петербургом.

Инфузорий культивировали в минеральной среде Принггейма следующего состава: 0.85 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.35 mM KCl, 0.08 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.11 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O. В качестве корма инфузорий использовали одноклеточные водоросли *Chlorogonium* sp. (Ammermann et al., 1974).

Местоположение нуклеотида, с которого начинается транскрипция генов тубулина, определяли, используя секвенирование ДНК и обратную транскрипцию мРНК (primer extension). Электрофорез на одном ПАА-геле фрагментов ДНК, полученных в результате секвенирования ДНК и обратной транскрипции мРНК при использовании одинаковых праймеров в обеих реакциях, позволяет получать электрофорограмму, на которой электрофоретическая полоса с фрагментами ДНК, полученными в результате секвенирования, находящаяся на том же расстоянии от старта электрофореза, что и электрофоретическая полоса, содержащая фрагменты ДНК, полученные в результате обратной транскрипции мРНК, определяет

местоположение нуклеотида, с которого начинается транскрипция.

Секвенирование всех генов выполнялось по методу Сангера с соавторами (Sanger et al., 1977) в соответствии со стандартным протоколом (USB Corp. T7 Sequencing Kit). Для последующей визуализации результата использовали меченные радиоактивной серой нуклеотиды [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S. Меченные НТФ получены в фирме ICN.

Реакцию обратной транскрипции РНК выполняли по методике Самбрука с соавторами (Sambrook et al., 1989) с использованием тотальной РНК *S. lemnae*. В этом случае на мРНК отжигаются радиоактивно меченные ДНК-праймеры, которые затем удлиняются при помощи фермента обратной транскриптазы с образованием комплементарных цепей ДНК (рис. 1). При наращивании праймера по направлению к 3'-концу молекулы мРНК полученный фрагмент ДНК будет обрываться в точке начала цепи мРНК, т. е. на том нуклеотиде, с которого начинался синтез мРНК на матрице ДНК.

В качестве метки использовали радиоактивный изотоп фосфора <sup>32</sup>P, которым метились 5'-концы праймеров.

Макронуклеарную РНК *S. lemnae* выделяли по следующему протоколу. Клетки собирали на фильтре и переносили в каплю раствора Принггейма объемом 2 мл. В пробу добавляли 2 мл двукратного буфера для протеиназы К (200 mM Трис-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 25 mM ЭДТА и 2% ДСН), хорошо перемешивали и переносили ее в пробирку объемом 10 мл. Затем в пробу добавляли 25 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и инкубировали ее при 50 °C в течение 1 ч. Центрифугировали пробу 10 мин (4000 об/мин) и супернатант переносили в другую пробирку. Образец экстрагировали дважды фенол-хлороформом. Материал разделяли на порцию по 300 мкл. Содержимое пробирок осаждали этанолом и осадок высушивали. Для оценки количества выделенной РНК растворяли содержимое одной пробирки в 11 мкл дистиллированной воды и использовали 1 мкл раствора для гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Мини-хромосомы, несущие гены  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -тубулина, были выделены и клонированы в плазмидах pUC12 и pTZ18U Хельфтенбайн и Мюллером (Helftenbein, Muller, 1988) и получены нами из коллекции плазмид д-ра Г. Штайнбрюка (G. Steinbrueck, Зоологический институт Тюбингенского университета, г. Тюбинген, Германия).

Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E. coli* с использованием стандартных наборов реактивов фирмы QIAGEN (Minipreparation, Maxipreparation of plasmid DNA) или же использовали экспресс-метод выделения ДНК (Ausubel et al., 1989; Goode, Feinstein, 1992).

ПАА-гель представлял собой 6%-ный раствор ПАА в 50%-ном растворе мочевины, приготовленном на однократном буфере ТВЕ. Для ускорения желатинизации раствора ПАА в него добавляли 20 мкл ТЭМЭД и 200 мкл 10%-ного раствора ПСА на 100 мл. Раствор ПАА заливали между двумя стеклами длиной либо 20, либо 50 см в зависимости от желаемой разрешающей способности. Электрофорез проводили в однократном буфере ТВЕ в течение 3 ч при напряжении электрического поля 900 В. Перед нанесением образцов гелю давали разогреться при напряжении электрического поля 900 В в течение 30 мин. Использовали Трис-боратный буфер следующего состава: Трис — 0.1 M, борная кислота — 0.083 M, ЭДТА — 0.001 M, pH 8.3.

## Результаты

В результате электрофореза фрагментов ДНК, полученных секвенированием ДНК и обратной транскрипцией мРНК исследуемых генов на одном ПАА-геле, было обнаружено, что фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования, обладают меньшей электрофоретической подвижностью, чем фрагменты ДНК, имеющие такие же длину и нуклеотидный состав, полученные в результате обратной транскрипции. Различие в электрофоретической подвижности одинаковых фрагментов ДНК выражается в том, что на получаемых электрофорограммах ПАА-гелей электрофоретические полосы, содержащие фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования, находятся на меньшем расстоянии от линии старта электрофореза, чем электрофоретические полосы, содержащие фрагменты ДНК тех же длины и нуклеотидного состава, полученные в результате обратной транскрипции. Рассмотренные различия в электрофоретической подвижности анализируемых фрагментов ДНК значительно затрудняют точное толкование получаемых электрофорограмм.

Было обнаружено, что причина различия электрофоретической подвижности состоит в присутствии фосфорилированных групп на 5'-конце праймеров, используемых в обратной транскрипции мРНК, и их отсутствии у праймеров для секвенирования ДНК, что рекомендуется стандартными протоколами указанных методов. Различие электрофоретической подвижности фрагментов ДНК, имеющих одинаковые длину и нуклеотидный состав, полученных в результате секвенирования ДНК с применением нефосфорилированных и фосфорилированных праймеров, доказано в контрольном эксперименте (рис. 2). На рис. 2 видно, что продукты секвенирования ДНК, произведенного с использованием фосфорилированных праймеров, более подвижны в геле и находятся в нем дальше от старта, чем соответствующие по размеру

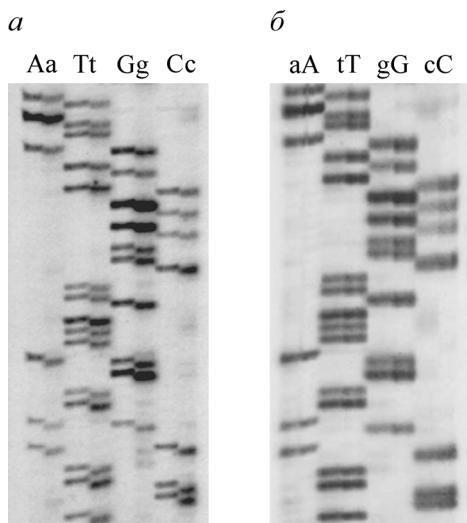


Рис. 2. Электрофорограмма ПАА-гелей, полученная в результате электрофореза фрагментов ДНК, при секвенировании гена  $\alpha 1$ -тубулина.  
а — прописными буквами обозначены дорожки, на которые нанесены фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования ДНК, в котором использовались нефосфорилированные праймеры, строчными буквами — дорожки, на которые нанесены фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования ДНК, в котором использовались фосфорилированные праймеры; б — праймеры фосфорилированы в обоих случаях.

*a* — прописными буквами обозначены дорожки, на которые нанесены фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования ДНК, в котором использовались нефосфорилированные праймеры, строчными буквами — дорожки, на которые нанесены фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования ДНК, в котором использовались фосфорилированные праймеры; *b* — праймеры фосфорилированы в обоих случаях.

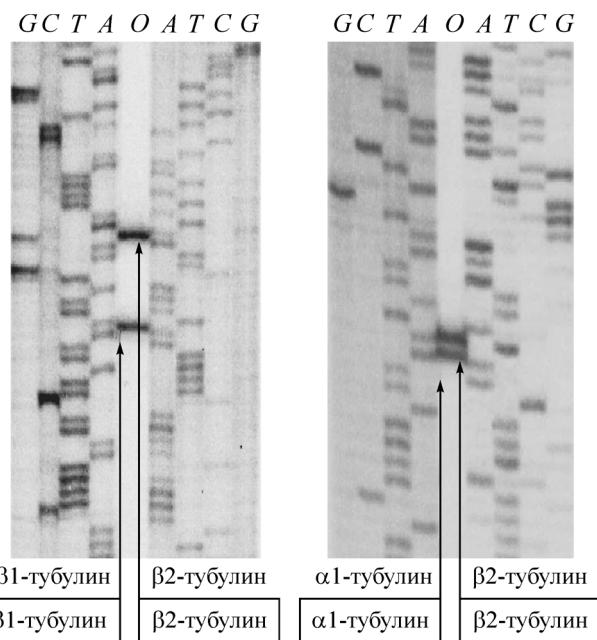


Рис. 3. Электрофорограммы ПАА-гелей, полученные в результате электрофореза фрагментов ДНК, синтезированных в результате секвенирования ДНК и обратной транскрипции мРНК генов  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -тубулина инфузории *Styloynchia lemnae*. Буквами *A*, *T*, *G* и *C* обозначены дорожки ПАА-гелей, электрофоретические полосы которых содержат фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования ДНК генов; буквой *O* — дорожки ПАА-гелей, электрофоретические полосы которых содержат фрагменты ДНК, полученные в результате обратной транскрипции мРНК; стрелками обозначены электрофоретические полосы, содержащие фрагменты ДНК, полученные в результате обратной транскрипции мРНК генов.

молекулы ДНК, синтезированные на основе нефосфорилированных праймеров (рис. 2). Такого различия в электрофоретической подвижности продуктов обеих реакций можно избежать, если в обоих случаях использовать фосфорилированные праймеры (рис. 2). Подобным образом можно устранить и различие в электрофоретической подвижности продуктов секвенирования ДНК и обратной транскрипции мРНК. При секвенировании ДНК с использованием праймеров, фосфорилированных нерадиоактивным фосфором, на получаемой электрофорограмме ПАА-геля электрофоретическая полоса, содержащая фрагменты ДНК, полученные в результате обратной транскрипции мРНК, располагается на том же расстоянии от старта, что и электрофоретическая полоса, содержащая продукты секвенирования гена той же величины (рис. 3).

В результате секвенирования ДНК были определены нуклеотидные последовательности в участках генов  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -тубулина инфузории *S. lemnae*, в которых локализуются нуклеотиды, с которых начинаются транскрипция и трансляция генов (рис. 4).

В результате анализа электрофорограмм путем сопоставления местоположения электрофоретических полос, содержащих фрагменты ДНК, полученных в результате секвенирования ДНК и обратной транскрипции мРНК, произведенного описанным методом, было определено местоположение нуклеотидов, с которых начинается транскрипция в исследуемых генах. Согласно нашим данным, в генах  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -тубулина нуклеотиды, с которых начинается синтез мРНК, находятся соответственно на 38, 38, 28 и 36 пар оснований левее триплета ATG, с которого начинается кодирующая область гена (рис. 4).

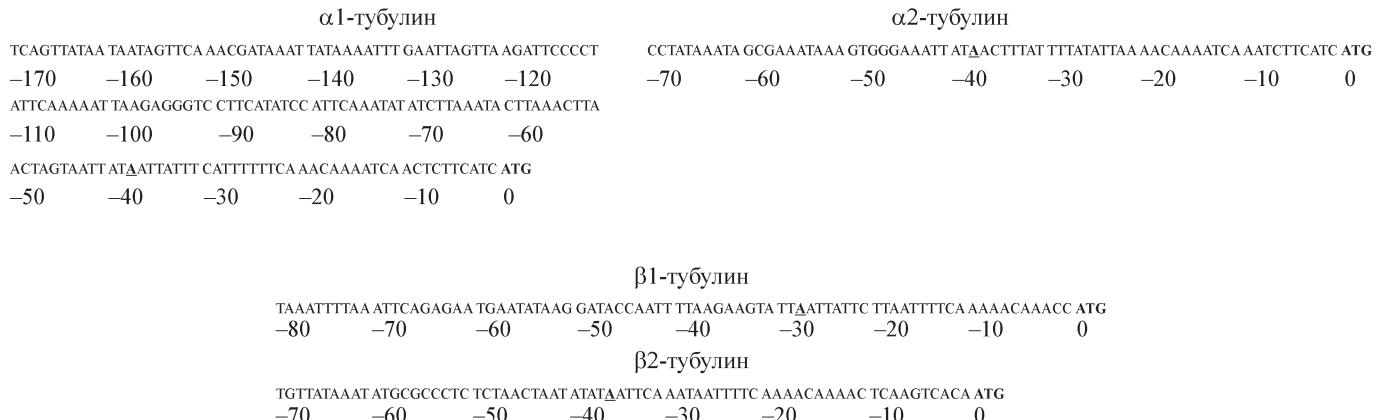


Рис. 4. Нуклеотидные последовательности генов  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ 1- и  $\beta$ 2-тубулина инфузории *Stylonychia lempae* в области нуклеотидов, с которых начинаются транскрипция и трансляция генов.

Представлены лидирующие некодирующие участки генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина; *жирным шрифтом* выделены триплеты ATG, с которых начинаются транслируемые участки генов; нуклеотиды, с которых начинается синтез мРНК, выделены *жирным шрифтом* с *подчеркиванием*.

## Обсуждение

В результате секвенирования генов тубулина инфузории *S. lempae* были получены такие же нуклеотидные последовательности, какие ранее были получены различными авторами при секвенировании тех же мини-хромосом (Helftenbein, 1985; Conzelmann, Helftenbein, 1987; Helftenbein, Muller, 1988; Helftenbein et al., 1989; Steinbrueck, 1990). В то же время полученные в настоящей работе данные о местоположении нуклеотидов, с которых начинается транскрипция в исследованных генах, отличаются от ранее опубликованных (Helftenbein, 1985; Conzelmann, Helftenbein, 1987; Helftenbein, Muller, 1988; Helftenbein et al., 1989; Steinbrueck, 1990; Skovorodkin et al., 1999). При этом в рассматриваемой литературе данные о местоположении нуклеотидов, с которых начинается синтез мРНК, также различаются.

Причиной этих разногласий, по-видимому, является различие используемых авторами методов. Классическим способом определения местоположения нуклеотидов, с которых начинается синтез мРНК, в генах мини-хромосом брюхоресничных инфузорий, используемым большинством исследователей, является так называемый метод  $S_1$ -картирования ( $S_1$  nuclease mapping), основанный на гибридизации меченых по 5'- или 3'-концу чаще всего одноцепочечных фрагментов молекулы ДНК и тотальной РНК организма с последующим расщеплением одноцепочечных молекул нуклеазой  $S_1$  (Хеймс, Хиггенс, 1987; Conzelmann, Helftenbein, 1987; Helftenbein, Muller, 1988). Образующийся фрагмент ДНК ограничен с одной стороны определенным сайтом рестрикции, по которому осуществлялось его вырезание из мини-хромосомы, а с другой — точкой начала транскрипции, что определяется присутствием молекулы РНК в РНК—ДНК-комплексе. Сравнительный анализ электрофорограмм, полученных в результате электрофореза таких продуктов нуклеазного расщепления ДНК и продуктов ее секвенирования на одном ПАА-геле, по мнению авторов, дает возможность говорить о местоположении нуклеотида, с которого начинается транскрипция исследуемых генов.

Существует вероятность того, что ДНК—РНК-гибридизация может происходить неоднозначно при повторностях опыта ввиду образования разного рода петель и шпилек в молекуле мРНК, что допускается температурным

режимом реакции. В результате комплекс ДНК—РНК и, следовательно, конечный продукт расщепления ДНК могут варьировать по длине, что приведет к неправильному определению местоположения нуклеотида, с которого начинается транскрипция исследуемых генов.

Одновременно с этим отсутствие в ранее опубликованных работах точной информации о деталях проведения секвенирования ДНК, в частности о месте отжига праймеров, не позволяет судить о корректности соотнесения местоположения фрагментов ДНК, полученных в результате секвенирования, с местоположением фрагментов ДНК, полученных в результате нуклеазного расщепления, на электрофорограмме ПАА-геля.

Другой способ определения местоположения нуклеотидов, с которых начинается транскрипция, использованный для их определения у ряда генов *Euploea* и *S. lempae*, основан на использовании секвенирования ДНК исследуемых мини-хромосом в сочетании с обратной транскрипцией соответствующей мРНК. Этот способ позволяет избежать ошибок и неточностей метода  $S_1$ -картирования, однако также не лишен недостатков. Наращивание специфических праймеров при обратной транскрипции приводит к получению фрагментов ДНК строго определенных размера и состава, точно соответствующих исследуемым участкам мРНК.

Использование одних и тех же праймеров и при секвенировании гена, и при обратной транскрипции мРНК приводит к тому, что стартовая точка для синтеза молекул ДНК в обеих реакциях оказывается одной и той же. Таким образом, фрагменты ДНК, полученные в результате обратной транскрипции мРНК, имеют такие же длину и электрофоретическую подвижность, как и фрагменты ДНК, полученные в результате секвенирования и ограниченные нуклеотидом, с которого начинается транскрипция гена. Электрофоретическая полоса с фрагментами ДНК, полученными в результате секвенирования, находящаяся на электрофорограмме на том же расстоянии от старта электрофореза, что и электрофоретическая полоса с фрагментами ДНК, полученными в результате обратной транскрипции мРНК, определяет местоположение нуклеотида, с которого начинается транскрипция.

Однако обнаруженные нами различия в электрофоретической подвижности фрагментов ДНК одинаковых длины и нуклеотидного состава, полученных в результате секвенирования ДНК и обратной транскрипции мРНК,

при использовании стандартных протоколов делают невозможным точное определение местоположения нуклеотида, с которого начинается синтез мРНК. Именно это обстоятельство, по нашему мнению, и является причиной различия данных в опубликованных ранее работах (Kaufmann, Klein, 1992; Ghosh et al., 1994; Bender, Klein, 1997; Skovorodkin et al., 1999).

На основании полученных в настоящей работе экспериментальных данных мы пришли к заключению о том, что наиболее адекватным методом определения местоположения нуклеотидов, с которых начинается транскрипция, является совместное использование секвенирования ДНК и обратной транскрипции мРНК исследуемого гена. При этом обязательным условием получения правильного результата при сопоставлении местоположения на электрофорограмме фрагментов ДНК, полученных в результате секвенирования ДНК, с местоположением фрагментов ДНК, полученных в результате обратной транскрипции мРНК, является фосфорилирование используемых для секвенирования праймеров нерадиоактивным фосфором.

С использованием рассмотренного метода установлено, что в генах  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -тубулина *S. lemnae* нуклеотиды, с которых начинается синтез мРНК, находятся соответственно на 38, 38, 28, 36 пар оснований левее триплета ATG, с которого начинается кодирующая область гена.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00662).

### Список литературы

- Пименов А. Ю., Райхель И. Б., Сквородкин И. Н., Подлипаева Ю. И., Скарлато С. О. 2006. *Stylonychia lemnae* — модельный объект для изучения мини-хромосом макронуклеуса инфузорий. Цитология. 48 (8) : 619—635.
- Хеймс Б., Хиггенс С. 1987. Транскрипция и трансляция. М.: Мир. 400 с.
- Ammermann D., Steinbrueck G., von Berger L., Hennig W. 1974. The development of the macronucleus in the ciliated protozoan *Stylonychia mytilus*. Chromosoma. 45 : 401—429.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidmann J. G., Smith J. A., Struhl K. 1989. Current protocols in molecular biology. Green Publ. Ass.
- Chung C. T., Niemela S. L., Miller R. H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86 : 2172—2175.
- Conzelmann K. K., Helftenbein E. 1987. Nucleotide sequence and expression of two beta-tubulin genes in *Stylonychia lemnae*. J. Mol. Biol. 198 : 643—653.
- Ghosh S., Jaraczewski J. W., Klobutcher L. A., Jahn C. L. 1994. Characterization of transcription, translation, and poly (A) addition sites in the gene-sized macronuclear DNA molecules of *Euploites*. Nucl. Acids Res. 22 : 214—221.
- Goode B. L., Feinstein S. C. 1992. «Speedprep» purification of template for double-stranded DNA sequencing. Bio Techniques. 12 : 148—149.
- Helftenbein E., Conzelmann K. K., Becker K. F., Fritzsch-Haft H. 1989. Regulatory structure of gene expression, DNA-replication and DNA-rearrangement in macronuclear genes of *Stylonychia lemnae*, a hypotrichous Ciliate. Eur. J. Protistol. 25 : 158—167.
- Helftenbein E., Muller E. 1988. Both alpha-tubulin genes are transcriptionally active in *Stylonychia lemnae*. Curr. Genet. 13 : 425—432.
- Kaufmann J., Klein A. 1992. Gene dosage as a possible major determinant for equal expression levels of gene encoding RNA polymerase subunits in the hypotrichous ciliate *Euploites octocarinatus*. Nucl. Acids Res. 20 : 4445—4450.
- Pimenov A., Zassoukhina I. B., Ammermann D., Skovorodkin I. N. 2002. Characterization of transcription initiator in alpha and beta tubulin genes of *Stylonychia lemnae*. In: 21 Jahrestagung der deutschen Gesellschaft fuer Protozoolie. Konstanz. 35.
- Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, sec. Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 57 : 5463—5467.
- Skovorodkin I. N., Bollgorn S., Ammermann D., Gunzl A. 1999. Stable transfection of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae* with tagged alpha 1 tubulin minichromosomes. Eur. J. Protistol. 35 : 70—80.
- Skovorodkin I. N., Zassoukhina I., Ammermann D., Guenzl A. 2001. Characterization of the promoter region in alpha-1 tubulin gene of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. In: XI Intern. Congr. Protozool. Salzburg. 13.
- Skovorodkin I. N., Zassoukhina I. B., Hojek S., Ammermann D., Gunzl A. 2001. Minichromosomal DNA replication in the macronucleus of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae* is independent of chromosome-internal sequences. Chromosoma. 110 : 352—359.
- Steinbrueck G. 1990. Recent advances in the study of ciliate genes. Eur. J. Protistol. 26 : 2—14.

Поступила 23 XI 2007

### TRANSCRIPTION START SITE DETERMINATION IN STYLONYCHIA LEMNAE TUBULIN GENES

A. Yu. Pimenov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: iamshura@yahoo.com

Contemporary experimental literature concerning transcription regulation study contains a lot of inconsistencies between data on precise transcription start site position in tubulin genes of hypotrichous ciliates. We have revealed that the reason of these inconsistencies lies in the methods applied by scientists. In present study, the basic methods of transcription start site identification were analyzed. The modification of transcription start site identification method based on the analysis of sequencing and primer extension reactions products on the same PAA gel was elaborated using *Stylonychia lemnae* tubulin genes as a model object. The use of non-phosphorylated primers in sequencing reaction (in accordance with standard procedure) leads to the appearance of band shifting which causes mistakes in results evaluation. This band shifting can be eliminated by the use of primers phosphorylated by non-radioactive phosphorus. In present study we applied this method to redetermine transcription start sites in  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - and  $\beta 2$ -tubulin genes of *S. lemnae*.

**Key words:** transcription start site, sequencing, primer extension.