

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ микроРНК MIR165A В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ ПРИ ИХ ОБЛУЧЕНИИ СВЕТОМ РАЗНОЙ ДЛИНЫ ВОЛНЫ

Д.Н. Федорин, В.О. Чуйкова, А.Т. Епринцев

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж, Россия*

**Аннотация.** Важнейшим фактором для развития и роста растения является свет, который выступает главным источником энергии. Кроме того, свет регулирует физиологические и биохимические процессы посредством фоторецепторных систем. Исследования показали, что особую регуляторную роль в организации клеточного метаболизма выполняют микроРНК, регулирующие экспрессию генов различными способами как на транскрипционном уровне, так и на посттранскрипционном. Существует значительное количество микроРНК, которые принимают участие в светозависимых механизмах регуляции генов-мишеней. МикроРНК miR165a является светозависимой, количество которой изменяется от состояния фитохромной системы. Применение такого специфического соосадителя ПЭГ 1500, разделяющего высокомолекулярные и низкомолекулярные РНК при фенол-хлороформной экстракции, позволило получить высокий выход микроРНК из суммарной клеточной РНК. Разработан зонд и специфические праймеры для количественной оценки miR165a в листьях кукурузы. Было установлено, что активная форма фитохрома вызывает увеличение концентрации анализируемой микроРНК в клетках листьев кукурузы, что показано с применением метода полимеразной цепной реакции в реальном времени. Изменение светового режима светолюбивых растений, например, кукурузы, связанного со снижением доли красного света в светопотоке, негативно отразится на клеточной регуляции, опосредованной miR165a.

**Ключевые слова:** кукуруза, микроРНК, полимеразная цепная реакция, регуляция, свет

## QUANTITATIVE CHANGES IN THE CONTENT OF MIR165A microRNA IN MAIZE LEAVES UNDER IRRADIATION WITH LIGHT OF DIFFERENT WAVELENGTHS

D.N. Fedorin, V.O. Chuykova, A.T. Eprintsev

*Voronezh State University, Voronezh, Russia*

**Abstract.** The most important factor for the development and growth of a plant is light, which acts as the main source of energy. In addition, light regulates physiological and biochemical

processes through photoreceptor systems. Studies have shown that microRNAs play a special regulatory role in the organization of cellular metabolism, regulating gene expression in various ways both at the transcriptional and post-transcriptional levels. There are a significant number of microRNAs that participate in the light-dependent mechanisms of regulation of target genes. miR165a microRNA is light-dependent, the amount of which varies depending on the state of the phytochrome system. The use of such a specific PEG 1500 coadjutor, which separates high-molecular and low-molecular RNAs during phenol-chloroform extraction, made it possible to obtain a high yield of microRNAs from the total cellular RNA. A probe and specific primers have been developed to quantify miR165a in corn leaves. It was found that the active form of phytochrome causes an increase in the concentration of the analyzed microRNA in the cells of corn leaves, which was shown using the real-time polymerase chain reaction method. A change in the light regime of light-loving plants, for example, corn, associated with a decrease in the proportion of red light in the light stream, will negatively affect the cellular regulation mediated by miR165a.

**Keywords:** corn, light, microRNA, polymerase chain reaction, regulation

### **Введение**

Неконтролируемый рост городского населения влечет за собой ряд глобальных экологических проблем, к которым относятся: потеря биоразнообразия, как растительного, так и животного; загрязнение экосистемы, изменение климатических условий и многое другое. Для решения проблемы урбанизации разрабатывают и внедряют программы по озеленению территорий. Исследование особенностей в заселенных людьми населенных пунктах представляет собой актуальное направление, важное в контексте распространения и закономерностей использования растений в декоративных целях. Интенсификация урбанизации способствует увеличению негативного влияния на растительные сообщества, но формируется недостаток знаний в этой области с точки зрения понимания адаптивных реакций организма в данных условиях [1].

Растения в хрупкой и искусственной экосистеме, такой как городская среда, могут выполнять множество экологических функций и оказывать полезные услуги для благополучия человека. Они способны регулировать климат; сокращать уровень CO<sub>2</sub> и других парниковых газов в ходе процесса фотосинтеза; задерживать поступающие осадки; предотвращать опасный сток воды [4].

Важнейшим фактором для развития и роста растения является свет, который выступает главным источником энергии, а также под его контролем находятся такие процессы как фотосинтез, прорастание семян, развитие листьев, удлинение стебля, фототропизм, период цветения и многое другое [2]. По отношению к интенсивности освещения растения делятся на светолюбивые (береза, липа, сосна, томат, кукуруза, лилия) и теневыносливые (бегония, клён, огурец, кабачок, петрушка). Растения обладают набором фоторецепторов, воспринимающих свет в видимой области. Наиболее важным из них является фитохромная система - это фоторецепторы, поглощающие красные и дальние красные части спектра. За счет цис-транс-изомеризации неактивная форма фитохрома (Фк) под действием красного света переходит в активную (Фдк), которая в свою очередь приводит к изменениям метаболизма и внутренней среды клетки через регуляцию транскрипции генов.

Последнее десятилетие связано с появлением огромного количества исследований, посвященных роли микроРНК, одноцепочечные РНК длиной 20-22 п.н., регулирующие экспрессию генов различными способами как на транскрипционном уровне, так и на посттранскрипционном. Зрелые микроРНК регулируют экспрессию генов путем подавления РНК-мессенджеров (мРНК) или индуцирования расщепления и деградации мРНК. miR связываются с частично комплементарными последовательностями мРНК-мишеней, тем самым контролируя стабильность мРНК и иницируя трансляционную репрессию генов-мишеней [5].

Изучение литературных данных позволило установить, что существует значительное количество микроРНК, принимающих участие в светозависимых механизмах регуляции генов-мишеней, в том числе и miR165a.

**Целью исследования** являлось выявление зависимости количественных изменений содержания miR165a в листьях кукурузы при облучении светом разной длины волны.

**Материал и методы исследования.** Объектами исследования являлись листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.), выращенной гидропонно при дневном 12 часовом свете.

При выращивании интенсивность света составляла  $90 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Постановку эксперимента по облучению растений светом разной длины волны осуществляли по описанной ранее методике [6].

Суммарную клеточную РНК выделяли модифицированным методом фенол-хлороформной экстракции. В качестве специфических осадителей использовали 12М LiCl, ПЭГ 1500, 96% спирт -для высокомолекулярной РНК, 2,5М LiCl, 96% спирт -для низкомолекулярной РНК [3].

Электрофорез осуществляли в геле 1% агарозы с красителем бромистый этидий.

Обратную транскрипцию miR165a проводили с использованием обратной транскриптазы MMLV. Праймером для микроРНК выступал специфично созданный зонд к miR165a. Параметры проведения обратной транскрипцию следующие: инкубация смеси при  $16^{\circ}\text{C}$  - 30 мин,  $42^{\circ}\text{C}$  - 30 мин,  $85^{\circ}\text{C}$  - 5 мин [7].

Полимеразная цепная реакция осуществлялась с набором AmpliSence (Хеликон, Россия) на приборе LightCycler96 (Roche, Швеция), используя в качестве красителя SYBR GreenI. Референсным геном выступал ген фактора элонгации ef-1 $\alpha$ . Нуклеотидный состав праймеров miR: прямой - 5' CACTGATCGGACCAGGCTTCA 3'; обратный - 5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCC 3'. Параметры ПЦР: предварительная денатурация -  $95^{\circ}\text{C}$  5 минут, цикл -  $95^{\circ}\text{C}$  - 30 сек.,  $58^{\circ}\text{C}$  - 30 сек.,  $72^{\circ}\text{C}$  - 30 сек. (детекция), финальная элонгация -  $72^{\circ}\text{C}$  - 10 минут.

Программа Opticon Monitor<sup>TM</sup> Software (Bio- Rad, США) и  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -метод использовалась для расчета относительного уровня транскриптов miR165a.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

#### *Разработка зонда для оценки количества свободной miR165a*

В 2005 году Чен и др. впервые предложили новый метод количественного определения в реальном времени для надежного и чувствительного обнаружения зрелых MIR<sub>s</sub>. Благодаря высокой точности и чувствительности qRT-ПЦР со стволовой петлей стала популярным методом обнаружения микроРНК в биомедицинской области. Данный подход

требует создания для конкретной микроРНК специфический праймер, имеющий вид «стебель-петля» [8].

Создание зонда к miR165a для количественной оценки методом ПЦР в реальном времени включало несколько этапов. Последовательность интересующей микроРНК: 5'-UCGGACCAGGCUUCAUCCSS-3'. Для получения ПЦР-продукта размером более 70 п.н. использовали 44 нуклеотидную последовательность (HV1), имеющую вид «стебель-петля».

2. 5'-GTTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC-3'

К 3'-концу HV1 добавили 6 п.н. комплементарных 3'-концу miR\_165a.

3. 5'-GTTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGGGAT-3'

По завершению реакции обратной транскрипции получили кДНК (miR165a-HV1) размером 80 п.н.

*Выделение суммарной клеточной фракции микроРНК из листьев кукурузы при облучении светом разной длины волны*

Для экспериментального исследования микроРНК (miR165a) первым главным шагом является выделение суммарной РНК без следов деградации. Метод фенол-хлороформной экстракции с использованием 12М LiCl и 96% спирта позволяет эффективно извлекать из листьев кукурузы всю фракцию как высокомолекулярной, так и низкомолекулярной РНК. Результаты электрофоретического и денситометрического исследования наглядно показывают это (рис. 1).

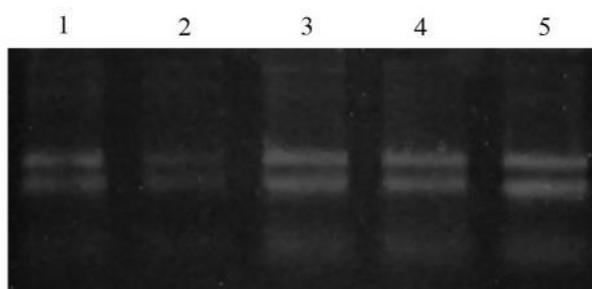


Рисунок 1 – Качественное определение в 1% агарозном геле суммарной клеточной РНК из листьев кукурузы при облучении светом разной длины волны: 1 – растения, освещенные белым светом; 2 – растения, выдержанные в темноте растения; 3 – растения, подвергшиеся облучению светом с длиной волны 660 нм; 4 – растения, подвергшиеся облучению светом с длиной волны 730 нм; 5 – растения, подвергшиеся последовательному облучению светом с длиной волны 660 нм и 730 нм

Модификация данной методики заключается в применении такого специфического соосадиателя, как полиэтиленгликоля со степенью полимеризации 1500 (ПЭГ 1500). Этот водорастворимый полимер способен экранировать фракцию высокомолекулярной РНК, тем самым, не давая ей связаться с хлоридом лития. Последовательное использование 2,5М LiCl осаждает свободные низкомолекулярные нуклеиновые кислоты, в том числе и miR165a.

Электрофоретический метод демонстрирует, что ПЭГ 1500 даёт высокий процент выхода малых РНК, так как следов высокомолекулярных нуклеиновых кислот в 1% геле агарозы обнаружено не было (рис. 2).

1 2 3 4 5



Рисунок 2 – Качественное определение микроРНК очищенной из суммарной РНК клеток листьев кукурузы при облучении светом разной длины волны в 1 % агарозном геле.

Обозначения: см. рисунок 1

*Оценка количества свободной miR165a в листьях кукурузы при облучении растений светом разной длины волны*

Для оценки содержания свободной miR165a в образцах растений, которые подвергались разным условиям светового облучения, применили метод количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Наибольший относительный уровень микроРНК обнаруживался в растениях, стоящих на свету, и тех, которые подвергались облучению красным светом с длиной волны 660 нм. Результаты ПЦР показывают наличие фитохромной зависимости между относительным уровнем транскриптов микроРНК и условиями облучения растений. Количество miR165a в образце «свет» в 1,81 раза больше показателя «темнота» (табл. 1).

Таблица 1. Относительный уровень свободной miR165a в листьях кукурузы при различном световом режиме (n=4, p ≤ 0.05)

	Условия освещения растений				
	свет	темнота	КС	ДКС	КС+ДКС
Содержание miR165a, отн. ед.	1	0,55	0,81	0,27	0,31

Обозначения: см. рисунок 1.

После облучения КС (660 нм) показатель относительного уровня miR165a в 1,47 раза был больше, чем проба, фоторецепторы которой неактивны. Это отражает прямую зависимость содержания микроРНК от активности фитохромной системы.

Таким образом, можно установить, что содержание зрелой микроРНК miR165a зависит от состояния фитохромной системы. Более того, выявлено, что активная форма фитохрома способствует увеличению количества анализируемой микроРНК.

### Заключение

Результаты проведенного исследования показывают зависимость между изменением содержания miR165a в листьях кукурузы и облучением светом разной длины волны. Существует множество методов извлечения высококачественной РНК из тканей растений, но не все из них предпочтительны для анализа микроРНК. Модифицированный метод фенол-хлороформной экстракции с применением специфического соосадителя ПЭГ 1500 позволяет получить высокий процент выхода микроРНК, в том числе и miR165a. Это происходит за счет связывания полимера и высокомолекулярных нуклеиновых кислот, а также последующего осаждения малых РНК 96 % спиртом.

Оценка количества свободной miR165a в листьях кукурузы при облучении светом разной длины волны позволяет установить, что содержание анализируемой miR165a зависит от состояния фитохромной системы. Следовательно, изменение спектрального состава света играет важную роль в организации клеточного метаболизма, осуществляемого посредством микроРНК miR165a, увеличение которой при преобладании красного света вызывает регуляцию соответствующих генов-мишеней. Изменение условий освещения светлюбивых растений, например, кукурузы, связанного со снижением доли красного света в светопотоке, негативно отразится на клеточной регуляции, опосредованной miR165a.

### Список литературы

1. Урбанofлористика в России: современное состояние и перспективы / А. С. Третьякова [и др.] // *Turczaninowia*. – 2021. – Т. 24. – № 1. – С. 125-144. – DOI: 10.14258/turczaninowia.24.1.15.
2. Федорин Д.Н. Механизм трансдукции светового сигнала в растительной клетке / Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев. — Воронеж.: ООО «Центрально-Черноземное книжное издательство», 2022. — 184 с.
3. Федорин Д.Н. Модификация методики выделения микроРНК из растений фенол-хлороформной экстракцией с применением полиэтиленгликоля 1500 / Д.Н. Федорин, В.О. Чуйкова, А.Т. Епринцев // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2022. – Т. 22. – № 6. – С. 885-892. – Doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10895.
4. Fineschi S. A. Survey of Multiple Interactions Between Plants and the Urban Environment / S. Fineschi, F. Loreto // *Front. For. Glob. Change*. – 2020. – V. 30. – P. 3-30. – Doi: 10.3389/ffgc.2020.00030.
5. Siddika T. Bringing MicroRNAs to Light: Methods for MicroRNA Quantification and Visualization in Live Cells / T. Siddika, I.U. Heinemann // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2021. – V. 8. – Doi: 10.3389/fbioe.2020.619583.
6. Eprintsev A.T. Expression of genes encoding subunits A and B of succinate dehydrogenase in germinating maize seeds is regulated by methylation of their promoters / A.T. Eprintsev, L.A. Karabutova, A.U. Igamberdiev // *Journal of Plant Physiology*. – 2016. – V. 205. – P. 33-40.
7. Kramer M.F. STEM-LOOP RT-qPCR for miRNAs / M.F Kramer // *Curr Protoc Mol Biol*. – 2011. – CHAPTER 15: Unit15.10. – Doi: 10.1002/0471142727.mb1510s95.

8. Universal Stem-Loop Primer Method for Screening and Quantification of MicroRNA / L.H. Yang [ et al.] // PLoS ONE. – 2014. – V. 9. – Doi.org/10.1371/journal.pone.0115293.

### References

1. Urbanism in Russia: the current state and prospects / A.S.Tretyakova [et al.] // Turchaninoviya. – 2021. – Vol. 24. – No. 1. – pp. 125-144. – DOI: 10.14258/turchaninovia.24.1.15.
2. Fedorin D.N. The mechanism of light signal transduction in a plant cell / D.N. Fedorin, A.T. Yeprintsev. – Voronezh : LLC Central Chernozem Book Publishing House, 2022. – 184 p.
3. Fedorin D.N. Modification of the technique for isolating microRNAs from plants by phenol-chloroform extraction using polyethylene glycol 1500 / D.N. Fedorin, V.O. Chuikova, A.T. Yeprintsev // Sorption and chromatographic processes. – 2022. – vol. 22. – No.6. – pp. 885-892. – Doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10895
4. Fineski S. A. Investigation of multiple interactions between plants and the urban environment / S. Fineski, F. Loreto // The front. For. The ball. Change. – 2020. – V. 30. – P. 3-30. – Doi: 10.3389 / ffgc.2020.00030.
5. Siddiq T. Detection of microRNAs: methods of quantitative determination and visualization of microRNAs in living cells / T. Siddiq, I.W. Heinemann // The front. Bioengineering. Biotechnologist. – 2021. – V. 8. – Doi: 10.3389/fbioe.2020.619583.
6. Eprintsev A.T. Expression of genes encoding succinate dehydrogenase subunits A and B in germinating corn seeds is regulated by methylation of their promoter domain / A.T. Eprintsev, L.A. Karabutova, A.U. Igamberdiev // Journal of Plant Physiology. – 2016. – Vol. 205. – pp. 33-40.
7. Kramer M.F. STEM-LOOP RT-qPCR for microRNAs / M.F. Kramer // Protocol Curr Mol Biol. – 2011. – CHAPTER 15: Unit15.10. – Doi: 10.1002 /0471142727.mb1510s95.
8. Universal Stem loop primer method for screening and quantification of microRNAs / L.H. Yang [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9. – Doi.org/10.1371/journal.pone.0115293.