



УДК 574.5; 595.36; 577.2

## Использование RACE ПЦР для получения частичной последовательности, кодирующей Abcb-подобный белок у *Gammarus lacustris* (Sars, 1863)

В. В. Павличенко<sup>1</sup>, М. В. Протопопова<sup>1</sup>, Т. Люкенбах<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

<sup>2</sup> Центр экологических исследований им. Гельмгольца, Лейпциг

E-mail: [vpavlichenko@gmail.com](mailto:vpavlichenko@gmail.com)

**Аннотация.** Описываются преимущества и недостатки метода RACE ПЦР для выявления полнотекстовых мРНК у организмов с неизвестным геномом. При помощи RACE ПЦР удалось идентифицировать частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую один из ABC-транспортёров у представителя пресноводных амфипод *Gammarus lacustris*.

**Ключевые слова:** механизм множественной устойчивости к ксенобиотикам, амфиподы, ABC-транспортёры, RACE ПЦР.

Одним из важнейших биологических путей метаболизации ксенобиотиков является механизм множественной резистентности к ксенобиотикам (MXR – MultiXenobiotic Resistance). В основе этого неспецифического процесса лежит активность транспортных мембранных белков-переносчиков (ABC-транспортёров), функционирующих за счёт энергии АТФ [2].

Наиболее изученным из всех белков суперсемейства ABC-транспортёров является белок Р-гликопротеин (Р-gp) – мембранный белок-переносчик с широкой специфичностью, выводящий из клеток обширный спектр ксенобиотиков [3], а выводящая активность Р-gp принимается в качестве ключевого показателя активности всей системы множественной резистентности к ксенобиотикам клетки или целого организма [5].

Особый интерес в области изучения экологического аспекта функционирования белков-транспортёров представляют исследования с использованием организмов, населяющих водоёмы с контрастными условиями среды, и имеющих поэтому широкие адаптивные способности. Одним из таких организмов является пресноводный палеарктический вид амфипод *Gammarus lacustris* (Sars, 1863), который нетребователен к химическому и температурному параметрам среды и приурочен преимущественно к стоячим водоёмам, характеризующимся широким спектром абиотических условий [1].

Целью данного исследования явилось *de novo* секвенирование гена, кодирующего Р-гликопротеин-подобный (Abcb-подобный) белок у *G. lacustris*.

Так как для амфипод не известны близкородственные референтные геномы, на основании которых можно было бы сконструировать рабочие

праймеры и амплифицировать полнотекстовую кДНК, нами были сконструированы дегенеративные праймеры на основании последовательностей, кодирующих гомологичные белки у других представителей беспозвоночных. На первом этапе с помощью ПЦР с дегенеративными праймерами была получена короткая (88 п.о.) нуклеотидная последовательность, которая согласно проведённому BLAST-анализу кодирует один из белков, относящихся к подсемейству ABCB семейства ABC. Подсемейство ABCB (согласно классификации ABC-транспортёров *H. sapiens*) содержит в себе 11 ортологов, отличающихся по функции, локализации и строению. Белок Р-гликопротеин относится к первому подсемейству (ABCB1), поэтому для более точной аннотации полученного короткого участка кДНК необходимо было его расширить до полнотекстовой мРНК. Одним из способов определения полной нуклеотидной последовательности мРНК является проведение неспецифической ПЦР для «быстрой амплификации концов кДНК» (от англ. Rapid Amplification of cDNA Ends – RACE). Для проведения RACE ПЦР мы использовали коммерческий набор реагентов SmarterRACE KIT (Takara Clontech, Япония) в соответствии с методикой фирмы-производителя с авторскими дополнениями [4]. Данный подход основан на проведении неспецифических ПЦР-реакций с двумя типами матриц полнотекстовых кДНК, несущих на своих 3'- и 5'-концах специфические адаптерные последовательности (3'-кДНК и 5'-кДНК). В качестве праймеров для такого рода ПЦР используют генспецифичный- и адаптер-специфичный праймеры. Результатом таких реакций является «полу-неспецифическая амплификация» (за счёт использования лишь одного специфического праймера), позволяющая получать недостающие 5'- или 3'-фрагменты искомой кДНК. Специфические праймеры для проведения данной реакции были разработаны на основе ранее полученной короткой нуклеотидной последовательности, кодирующей Abcb-подобный белок у *G. lacustris*. В качестве неспецифических использовали праймеры (UPM - universal primer mix) из набора реагентов SmarterRACE kit. Из-за использования универсальных праймеров, комплементарных адаптерным последовательностям кДНК, специфичность реакции резко снижается, что в конечном итоге выражается в образовании множественных неспецифических продуктов ПЦР. Все полученные продукты неспецифической ПЦР-реакции были клонированы в клетках *E. coli* и секвенированы по методу Сенгера на секвенаторе ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Из всех неспецифических продуктов реакции были отобраны два, которые имели нуклеотидные последовательности, перекрывающиеся с изначально расширяемой последовательностью. На основе полученных нуклеотидных последовательностей при помощи компьютерной программы Sequencher v. 4.8 была сгенерирована общая нуклеотидная последовательность (GeneBank acc. no KF293375), корректность которой в дальнейшем была подтверждена результатами независимой ПЦР с использованием специфических (точных) праймеров с последующим клонированием и секвенированием полученного ПЦР-продукта. К сожалению, полученная нуклеотидная последовательность содержала лишь половину кодирующей части гена и дальнейшие

попытки расширить последовательность до полнотекстовой мРНК не увенчались успехом. В результате не удалось получить недостающую часть мРНК, включающую вторую половину кодирующей области, 3'-некодирующую область с сигналом полиаденилирования и непосредственно полиА-«хвост». Мы полагаем, что данный факт может быть связан с альтернативным синтезом кДНК с матрицы мРНК, обусловленным неспецифическим связыванием праймеров, содержащих адаптерную последовательность и тимин-богатый участок, со срединным участком мРНК, обогащённым аденином (по наблюдениям авторов). Подобные эффекты проявляются и при нормальном синтезе кДНК. Благодаря повышенному содержанию аденина в 3'-некодирующей области связывание праймера-затравки с полиА-«хвостом» при синтезе кДНК может происходить неспецифично, тем самым приводя к образованию множественных вариантов кДНК, отличающихся друг от друга длиной 3'-некодирующей области. Решение данной проблемы сводится к тому, чтобы сдвинуть реакцию синтеза кДНК в сторону образования наиболее длинных транскриптов, для чего применяют различные методики, позволяющие очистить смесь кДНК от коротких фрагментов. В случае описанного возможного неспецифического связывания универсальных праймеров-затравок с серединой мРНК при синтезе кДНК авторам не удалось найти эффективный путь решения этой проблемы.

В результате нами получена частичная (половина мРНК) нуклеотидная последовательность мРНК, кодирующая Abcb-подобный белок у пресноводных амфипод *G. lacustris*. Дальнейшие исследования будут направлены на идентификацию полной нуклеотидной последовательности мРНК, а также на аннотацию данного гена с целью выяснения его точной функциональной роли в организме пресноводных амфипод.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проектов РФФИ 14-04-31350 мол а и 14-04-31681 мол а, Министерства образования и науки РФ (соглашение № 8266), совместной программы Министерства образования и науки РФ и Германской службы академических обменов (DAAD) «Михаил Ломоносов II», международной программы DAAD для молодых учёных, программ международного консорциума «Эразмус Мундус». Авторы благодарят сотрудников Байкальского аналитического центра (ЦКП) СО РАН при Президиуме ИИЦ СО РАН за предоставленный доступ к оборудованию.*

#### Список литературы

1. Сафронов Г. П. Состав и экология видов рода *Gammarus fabricius* Юга Восточной Сибири : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 / Г. П. Сафронов. – Иркутск : ИГУ, 1993. – 176 с.
2. ABC transporters and multidrug resistance / ed. by A. Boumendjel, J. Boutonnat, J. Robert. – New Jersey : John Wiley and Sons, 2009. – 459 p.
3. Bellamy W. T. P-glycoproteins and multidrug resistance / W. T. Bellamy // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1996. – Vol. 36. – P. 161–183.
4. Identification of a putatively multixenobiotic resistance related Abcb1 transporter in amphipod species endemic to the highly pristine Lake Baikal / V. V. Pav-

lichenko, M. V. Protopopova, M. A. Timofeyev, T. Luckenbach // Environmental science and pollution research. – 2015. – Vol. 22, Issue 7. – P. 5453–5468.

5. Smital T. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* / T. Smital, R. Sauerborn, B. K. Hackenberger // Aquatic Toxicology. – 2003. – Vol. 65, N 4. – P. 443–465.

## Using the RACE PCR Method for Identification of Partial cDNA Encoding a Abcb-like Protein from *Gammarus lacustris* (Sars, 1968)

V. V. Pavlichenko<sup>1</sup>, M. V. Protopopova<sup>1</sup>, T. Luckenbach<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

<sup>2</sup> UFZ-Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig

**Abstract.** This study shows advantages and disadvantages of using rapid amplification of cDNA ends (RACE) for identification of protein coding sequences from species with no sequenced genome available. Using RACE we identified a partial protein coding sequence encoding a from the ABCB subfamily from the amphipod *Gammarus lacustris*.

**Keywords:** multidrug resistance, amphipods, ABC transporters, RACE PCR method.

Павличенко Василий Валерьевич  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
тел.: (3952) 42–46–59  
факс: (3952) 51–07–54  
e-mail: vpavlichenko@gmail.com

Pavlichenko Vasilii Valeryevich  
Candidate of Science (Biology),  
Senior Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
tel.: (3952) 42–46–59  
fax: (3952) 51–07–54  
e-mail: vpavlichenko@gmail.com

Протопопова Марина Владимировна  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
тел.: (3952) 42–46–59  
факс: (3952) 51–07–54  
e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Protopopova Marina Vladimirovna  
Candidate of Science (Biology),  
Senior Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
tel.: (3952) 42–46–59  
fax: (3952) 51–07–54  
e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Люкенбах Тиль  
кандидат наук, научный сотрудник  
Центр экологических исследований  
им. Гельмгольца  
D-04318, г. Лейпциг, ул. Пермосеритрассе, 15  
тел.: +49 (341) 235 15 14  
e-mail: till.luckenbach@ufz.de

Luckenbach Till  
PhD, Researcher  
UFZ-Helmholtz Centre for Environmental  
Research  
Pernosserstraße 15, D-04318 Leipzig,  
Germany  
tel.: +49 (341) 235 15 14  
e-mail: till.luckenbach@ufz.de