

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КДНК ГЕНА ХИТИНАЗЫ, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ КАЗАХСТАНСКОГО СОРТА ПШЕНИЦЫ СТЕПНАЯ 15

(ДГП Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина, г. Алматы)

Хитиназы относятся к группе гликозил – гидролаз, разрушающих гликозидную связь между двумя и более углеводными остатками, либо между углеводным и не углеводным компонентами клеточной стенки фитопатогенных грибов, затрудняя тем самым его проникновение в клетку растений и препятствуя развитию заболевания. Из пшеницы казахстанского сорта Степная 15 нами была клонирована кДНК гена хитиназы I класса *ChitSt15*, проведен сиквенс ее первичной последовательности и сравнительный анализ выравнивания нуклеотидной последовательности клонированного гена с генами других организмов

Раскрытие молекулярной природы защитных механизмов и развитие генно-инженерных технологий обеспечили возможность разработки принципиально новых стратегий борьбы с заболеваниями растений в дополнение к существующим традиционным селекционным и химическим подходам. Большинство альтернативных биотехнологических методов борьбы с грибными заболеваниями основано на конститутивной гиперпродукции какого-либо элемента защитной системы растений [1].

Хитиназы являются PR-белками, участвующими в расщеплении хитина клеточной стенки фитопатогенных грибов, затрудняя тем самым его проникновение в клетку растений и препятствуя развитию заболевания. Экспрессия этих белков в растениях в ответ на внедрение гриба является одним из важных факторов в общей системе, обеспечивающей защитную реакцию растения на заражение фитопатогенами [2, 3]. В настоящее время хитиназы, как и многие другие антигрибные протеины, исполь-

зуются для создания трансгенных растений с целью повышения их устойчивости к грибным патогенам.

В данной работе нами была секвенирована нуклеотидная последовательность клонированной из казахстанского сорта пшеницы Степная 15 кДНК гена хитиназы I класса, а также проведено множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов хитиназ других организмов по степени их гомологии к клонированному нами гену.

Материалы и методы

Секвенирование геномной последовательности клонированной кДНК гена хитиназы производили на секвенаторе Amersham Pharmacia Biotech ALFexpress II (“Amersham”). Биоинформационный анализ проводили при помощи программ Vector NTI Suite 9.0, а также BLASTN в режиме он-лайн на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Анализ множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей клонированного гена к генам других организмов (табл. 1) показал, что полученный нами ген *ChitSt15* имеет высокую тепень гомологии (от 97% до 81%) с генами хитиназы I класса пшеницы *Triticum aestivum* (GenBank AB029936.1; X76041.1), ржи *Secale cereale* (GenBank AB029936.1), хитиназ I класса ячменя *Hordeum vulgare* (GenBank AK248536.1), мятлика лугового *Bromus inermis*, (GenBank AB428423), овсяницы красной *Festuca arundinacea*, (GenBank EU837265.1), кукурузы *Zea diploperennis* (GenBank AY532766.1;

AY532759.1; AY532758.1), риса *Oryza sativa* (GenBank AK061280.1; NM_001065161.1) и геном хитиназы I класса растений банана *Musa x paradisiaca* (GenBank AY997529.2).

Кроме того, нами было установлено, что ген *ChitSt15* имеет 100% совпадение по длине с генами хитиназы пшеницы I класса (GenBank AB029936.1), эндохитиназой пшеницы сорта *Chinese spring* (GenBank X76041.1), генами хитиназы ржи (GenBank AF280437.1), ячменя (GenBank AK248536.1) и мятлика лугового (GenBank AB428423.1), несмотря на существующую разницу в их нуклеотидном составе.

Таблица 1. Выравнивание нуклеотидных последовательностей клонированного гена хитиназы *ChitI* (*St15*)

№	Название последовательности в GenBank	Номер в базе данных GenBank	Гомология по длине, п. н.	Идентичность нуклеотидной последовательности, %
1	<i>Triticum aestivum</i> cultivar Ning 7840 class I chitinase mRNA, complete	AY437443.1	100	97
2	<i>Triticum aestivum</i> Chi 3 mRNA for chitinase 3, complete cds	AB029936.1	100	97
3	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cDNA clone: FLbaf60j09, mRNA sequence	AK248536.1	100	94
4	<i>T. aestivum</i> (Chinese spring) chi gene for endochitinase	X76041.1	100	94
5	<i>Secale cereale</i> 31.7 kDa class I endochitinase-antifreeze protein precursor, mRNA, complete cds	AF280437.1	100	93
6	<i>Bromus inermis</i> BiCHT1 mRNA for chitinase, complete cds	AB428423.1	100	89
7	<i>Poa pratensis</i> chitinase (Chi3) pseudogene sequence	AF000965.1	99	89
8	<i>Poa pratensis</i> chitinase (Chi2) gene, complete cds	AF000966.1	99	89
9	<i>Poa pratensis</i> chitinase (Chi1) gene, complete cds	AF000964.1	99	88
10	<i>Festuca arundinacea</i> class I chitinase (Chit1) mRNA, complete cds	EU837265.1	99	88
11	<i>Phyllostachys edulis</i> cDNA clone: bphyem123i11, full insert sequence	FP101637.1	96	84
12	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) Os06g0726100	NM_001065161.1	93	82
13	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone:006-212-F06, full insert sequence	AK061280.1	93	82
14	<i>Zea diploperennis</i> isolate d8 chitinase (chiI) gene, complete cds	AY532766.1	98	81
15	<i>Zea mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> isolate chiI_G14 chitinase (chiI) gene, partial cds	EU724466.1	98	81
16	<i>Musa x paradisiaca</i> chitinase (Chi-1) mRNA, complete cds	AY997529.2	98	81
17	<i>Zea diploperennis</i> isolate d2 chitinase (chiI) gene, complete cds	AY532759.1	98	81
18	<i>Zea diploperennis</i> isolate d1 chitinase (chiI) gene, complete cds	AY532758.1	98	81
19	<i>Zea mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> isolate chiI_S4 chitinase (chiI) gene, complete cds	EU724470.1	98	81
20	<i>Zea mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> isolate chiI_G15 chitinase (chiI) gene, partial cds	EU724467.1	98	81

Полученные нами данные анализа по множественному выравниванию нуклеотидных последовательностей генов разных классов хитиназ и клонированного гена хитиназы *ChitSt15* позволили предположить с большой вероятностью, что она относится к хитиназам I класса на основании высокой степени ее гомологии (97%) с генами хитиназ I класса и низкой гомологии к хитиназам других классов (данные не показаны).

При проведении сравнительного выравнивания нуклеотидных последовательностей клонированного *ChitSt15* и *ChitI* генов, нами было обнаружено 27 нуклеотидных замен в первичной последовательности гена *ChitSt15* (табл. 2).

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, при обработке полученной нуклеотидной последовательности гена *ChitSt15* в программах, предоставляемых Интернет-ресурсом Swiss-Prot,

Таблица 2. Анализ мутаций в нуклеотидной последовательности клонированного гена *Chit St15* в Интернет-ресурсе Swiss-Prot

Замена в нуклеотидной последовательности	Замена в аминокислотной последовательности	Замена в нуклеотидной последовательности	Замена в аминокислотной последовательности
GCC => GTC	11 / Ala => Val	CAA => CAG	238 / Gln => Gln
ACC => ATC	53 / Thr => Ile	AAG => AAA	241 / Lys => Lys
GGA =>GGC	75 / Gly => Gly	CCT => CCC	242 / Pro => Pro
TCC => TCA	141 / Ser => Ser	TCG => TCA	243 / Ser => Ser
TGT => TGC	181 / Cys => Cys	CAC => CAT	245 / His => His
GGC => AGC	184 / Gly => Ser	ATT => ATC	248 / Ile => Ile
TCA => TCG	196 / Ser => Ser	GGC => GGT	256 / Gly => Gly
CTG => CTA	212 / Leu => Leu	GCC => ACC	257 / Ala => Thr
CTC => CTT	213 / Leu => Leu	GGT => GGC	268 / Gly => Gly
CTT => CTC	218 / Leu => Leu	GTT => GTC	288 / Val => Val
GCG => GCC	220 / Ala => Ala	GCC => GCT	289 / Ala => Ala
TCG => ACG	221 / Ser => Thr	TGC => TGT	299 / Cys => Cys
GTG => GTA	225 / Val => Val	CTA => CTC	302 / Leu => Leu
		GGC => GGT	303 / Gly => Gly

мы выявили, что только 5 из 27 определенных нуклеотидных замен оказались не синонимичными и привели к замене аминокислот в первичной структуре предполагаемого белка – продукта клонированного гена *ChitSt15*. При этом замена аланин (Ala) на валин (Val) произошла в 11 позиции, в 53 позиции аминокислота треонин (Thr) была заменена на изолейцин (Ile), а в 184 – замена глицина (Gly) на серин (Ser), в 221 позиции серин (Ser) был заменен на треонин (Thr) и в 257 позиции аланин (Ala) был заменен треонином (Thr). Значимость обнаруженных аминокислотных замен будет изучена при определении пространственной структуры белка.

Таким образом, в результате выполнения данной работы нами был установлен точный нуклеотидный состав клонированного из казахстанской пшеницы сорта Степная 15 гена хитиназы длиной 957 п.н., и определен класс хитиназ, к которому принадлежит продукт экспрессии, кодируемый геном *ChitSt15*. Кроме того, множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов хитиназ различных организмов по степени их гомологии к клонированному нами гену, показало высокую степень гомологии гена *ChitSt15* с генами хитиназ I класса, что подтвердило ее принадлежность к хитиназам этого класса. Было обнаружено 27 замен в нуклеотидном составе исследуемого гена по сравнению с исходным и установлено, что только пять из них

ведут к заменам в аминокислотном составе экспрессируемого белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шахбазов А.В., Карпель Н.А. Хитиназы в биоинженерных исследованиях // Генетика. 2008. **44**, № 8. С. 1013-1022.
2. Selitrennikoff C.P. Antifungal proteins // Appl. and Env. Microbiol. 2001. **67**. P. 2883-2894.
3. Muzzarelli R.A.A. // Chitin. Oxford: Pergamon Press, 1977.

Резюме

Хитиназалар екі немесе бірнеше көмірсу қалдықтарының арасындағы гликозидтік байланысты бұзатын гликозил-гидролаза тобына жатады не фитопатогенді саңырауқұлақтардың жасуша қабырғасының құрамындағы көмірсу және көмірсу емес компоненттерінің арасындағы гликозидтік байланысты бұза отырып саңырауқұлақтардың өсімдік жасушасының ішіне енуіне және аурудың дамуына кедергі жасайды. Бізбен қазақстандық Степная 15 бидай сортынан хитиназа генінің қДНК-сы клондалынды. Оның біріншілік нуклеотидтік қатар ретінің зерттеуі және клондалынған ген мен басқа организмдердің хитиназа генінің нуклеотидтік қатарының реті түзетілуінің салыстырмалы талдауы жүргізілді.

Summary

Chitinases belong to glycozyl - hydrolases that break glycosidic linkage in two or more carbohydrate residues hence aiming to dissociate polysaccharides from other composites of fungal membranes. This prevents phytopathogenic penetration into plant's cells and spread of a disease. We have cloned and sequenced cDNA of *ChitSt15* chitinase gene from Kazakhstan wheat «Stepnaya 15». The comparative analysis of chitinase gene sequences among different species was performed.