

Н. П. МАЛАХОВА, И. А. АХМЕТОЛЛАЕВ, Г. А. ИСМАГУЛОВА,  
Ш. К. МУРУМБАЕВА, О. М. БЛОХИНА, Г. А. ИСКАКОВА, Н. А. ЮРКЕВИЧ,  
С. П. ЧИРКИН, Ю. А. СКИБА, Н. А. АЙТХОЖИНА

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ХИТИНАЗЫ I КЛАССА ПШЕНИЦЫ

(ДГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина»  
РГП «Центр биологических исследований» КН МОН РК)

Хитиназы, экспрессирующиеся при взаимодействии растения с фитопатогенными микроорганизмами, участвуют в защитном ответе растения – хозяина. В настоящей работе был субклонирован ген хитиназы из пшеницы *T. aestivum L.* и экспрессирован в *Escherichia coli* BL 21(DE3)pLysS. Размер выделенной и очищенной клонированной хитиназы составлял 34кДа, выход хитиназы – 20 мг/Л.

Известно, что в отличие от животных и человека, растения не имеют собственной иммунной системы и становятся уязвимыми к воздействию различных неблагоприятных абиотических и биотических факторов. Противостоять вредным воздействиям окружающей среды растениям помогают сложные защитные механизмы, одним из которых является синтез новых патогениндуцируемых (PR) белков [1]. Хитиназы (ЕС 3.2.1.14) являются PR белками, которые участвуют в

расщеплении хитина клеточной стенки фитопатогенных грибов, затрудняя его проникновение в клетку растений и препятствуя развитию заболевания. Эти ферменты осуществляют гидролиз хитина, природного линейного полимера, который состоит из N-ацетилглюкозаминовых остатков и входит в состав клеточных стенок фитопатогенных грибов. Путем расщепления в-1,4 гликозидной связи до N-ацетилглюкозамина и N,N<sup>+</sup>-диацетилхитобиозы, хитиназы замедляют или прекращают

рост гифов и распространение инфекции в растении [2].

Хитиназы представляют собой большую и разнообразную группу ферментов, различающихся между собой не только пространственным и временным расположением, но и структурой молекул и специфичностью к субстрату. Идентифицировано более 100 генов хитиназ в различных растениях. По физико-химическим свойствам и типу ферментативной активности хитиназы отнесены к классу PR3, PR4, PR8, и PR11 белков, молекулярная масса большинства из которых варьирует от 26 до 43 кДа [3].

Функциональная роль хитиназ у растений, не имеющих в своем составе субстрата для действия этих ферментов, до конца не ясна. Хитин входит в состав клеточных стенок всех грибов и насекомых, т.е. организмов, которые напрямую могут влиять на растения и причинить им ущерб. В этой связи становится понятным существование такого разнообразия изоформ хитиназ у растений, играющих важную роль в их защитном ответе, так как количество биотических факторов, действующих на растения, просто огромно [4].

Огромные потери урожая пшеницы, связанные с различными заболеваниями, заставляют ученых и селекционеров проводить активные поиски способов защиты пшеницы от грибных патогенов. Одной из успешных стратегий в борьбе с заболеваниями считается усиление устойчивости растений к поражению за счет индукции в них сверхэкспрессии некоторых генов защитного ответа с помощью биологически активных веществ. Изучение скорости активизации и уровня экспрессии генов хитиназы у пшеницы позволит приблизиться к пониманию механизмов взаимодействия фитопатогенного гриба и растения на молекулярном уровне и в дальнейшем может послужить основой для разработки препаратов, повышающих устойчивость зерновых культур к заболеваниям, вызываемым фитопатогенными грибами.

Целью наших исследований было выделение, клонирование и экспрессия гена хитиназы пшеницы I класса, получение и наработка рекомбинантного белка для дальнейшего изучения его свойств.

### Материалы и методы

Для клонирования гена хитиназы пшеницы нами были использованы штамм BL 21(DE3)pLysS

*Escherichia coli*, вектор для трансформации pBlueScriptSK(+) и вектор для экспрессии pET22b. В работе использованы 9 сортов озимой пшеницы *Triticum aestivum* с разной степенью устойчивости к фитопатогенному грибу *Septoria nodorum* (Berk.), предоставленные профессором Койшибаевым М. К. (НИИЗКР). Для проведения молекулярно-биологических работ использованы реагенты фирмы «Ферментас» (Латвия).

Ген хитиназы I класса пшеницы, соответствующий основному белку, состоящему из 320 аминокислот, с молекулярным весом 34 кДа и изоэлектрической точкой около 7.02, был амплифицирован с использованием прямого и обратного праймеров. Синтез полного гена хитиназы без стоп-кодона и фрагмента с мутантными праймерами и создание вставки для встраивания в плазмиду производили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакционная смесь содержала 75 мМ Трис-НСI (рН 8,8), 20 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,01 % Tween-20, 0,1 мкг кДНК, по 0,1 мкМ каждого из праймеров Chit1 и Chit2 для гена хитиназы или праймеров Ubi1, Ubi2 для гена убикутина в качестве контроля, смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) по 200 мкМ каждого. 2 ед Termostar ДНК-полимеразы добавляли после начальной денатурации при 95 °С в течение 5 минут. Подтверждение синтеза нужного фрагмента гена хитиназы пшеницы I класса определяли с использованием следующих праймеров:

1) для гена хитиназы:

Chit-f 5'-ATGAGA GAGTTGTG GTG GTG GC-3',  
Chit rev - 5'-CGG CCA CCT CGC GCT TC-3';

2) для фрагмента с мутантными праймерами:

Chit mut-f - 5'-GTA CATATG AGA GGA GTT GTG GTG GTG G-3',

Chit mut-rev - 5'-TAA AGC TTT GCG AAC GGC CTC TGG TT-3'.

Последовательности мутантных праймеров содержали сайты рестрикции для *NdeI* и *BamHI* (выделены жирным). Амплификацию на приборе Authorized Thermal Cycler, Eppendorf проводили в 35 циклов: 94 °С – 1 мин., 59 °С – 1 мин., 72 °С – 1 мин. 30 сек. и финальную элонгацию при 72 °С – 5 мин.

Для синтеза полного гена хитиназы, не содержащего стоп-кодон и фрагмента с мутантными праймерами, была использована высокоточная LR-полимераза (long reading) фирмы Силекс,

Россия. Реакционная смесь содержала 70 mM Трис-НСl (рН 9.3), 16,6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) по 100 мкМ каждого, по 0,1 мкМ каждого из праймеров Chit-f, Chit-rev и Chit mut-f, Chit mut-rev и 5 ед. LR-полимеразы.

Выделение плазмид, их трансформацию и стандартные манипуляции с ДНК проводили согласно стандартным протоколам [5]. Наличие вставки в полученной плазмиде проверяли при помощи ПЦР с праймерами для получения полного гена хитиназы I класса.

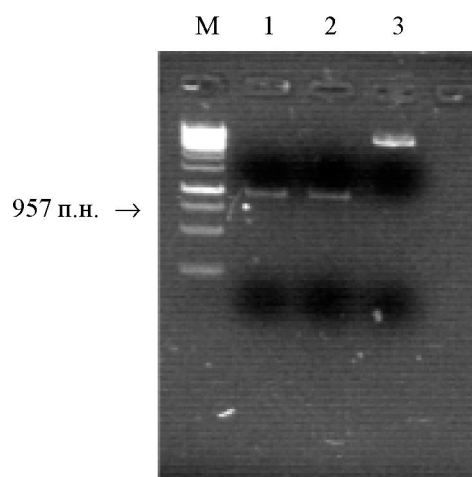
Индукцию *E.coli* BL21(DE3)pLysS для получения рекомбинантного белка, его выделение и очистку проводили в соответствии с протоколом [6, 7].

Электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях проводили на приборе Mini-Protean II Electrophoretic Cell фирмы Bio-Rad (США) по стандартной методике. Гель окрашивали Coomassie Blue R250.

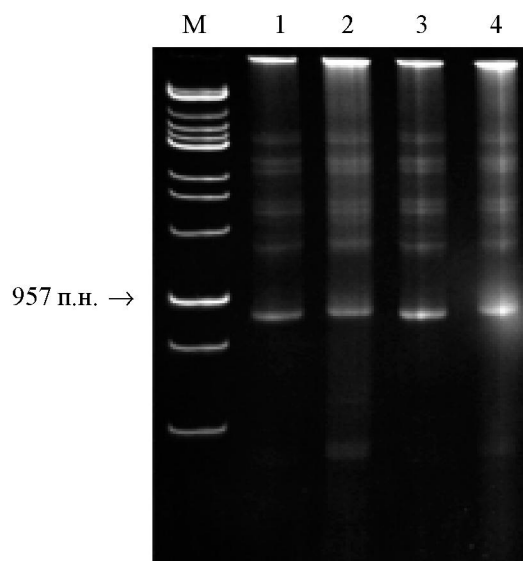
### Результаты и обсуждение

Ген пшеницы (GenBank Accession № AY437443) *Triticum aestivum* сорта Ning 7840, кодирующий фермент хитиназы первого класса, был клонирован из кДНК пшеницы казахстанского сорта Степная 15, наработан и экспрессирован в клетках *E. coli* BL21(DE3)pLysS с помощью праймеров, синтезированных в лаборатории генома. Нами были рассчитаны и использованы праймеры Chit-f и Chit-rev для гена хитиназы, которые позволили амплифицировать функционально значимый участок гена без стоп-кодона, который затем субклонировали для наработки в плазмиду pBlueScriptSK(+). На рис. 1 представлены результаты амплификации клонированного участка гена хитиназы с открытой рамкой считывания с праймерами Chit-f и Chit-rev. Был получен фрагмент гена хитиназы, соответствующий ожидаемому, имеющий размер 957 п.н.

После амплификации с мутантными праймерами, фрагмент гена хитиназы с сайтами рестрикции был переклонирован в вектор pET22B для экспрессии рекомбинантного белка. Для этого двумя ферментами рестрикции *NdeI* и *HindIII* нами была проведена рестрикция экспрессионного вектора pET22B и вставки гена хитиназы, синтезированной при помощи мутантных праймеров с последующим их лигированием друг на



**Рис. 1.** Амплификация участка гена хитиназы с праймерами Chit-f и Chit-rev: М – маркер молекулярного веса; 1, 2 дорожки – амплифицированный фрагмент гена хитиназы пшеницы I класса; 3 дорожка – ДНК плазмиды pBlueScriptSK(+)



**Рис. 2.** Электрофорез амплифицированных фрагментов гена хитиназы пшеницы I класса с праймерами для получения полного гена без стоп-кодона и фрагменты, полученные после амплификации с мутантными праймерами к хитиназе: М – маркер молекулярного веса, 1-2 дорожки – фрагменты гена хитиназы без стоп-кодона 957 п.н., 2-3 дорожки – фрагменты-ампликоны гена пшеницы с мутантными праймерами по сайтам рестрикции *NdeI* и *BamHI*

друга. Полученная таким образом плаزمид трансформировалась в клетки *E.coli* BL21(DE3)pLysS для экспрессии рекомбинантного белка.

