

УДК 632.959

**КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ХИТИНАЗЫ 19 СЕМЕЙСТВА ИЗ *D. CAPENSIS*****И.Г. Синельников***Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН*

Хитиназы (КФ 3.2.1.14) – эндо-ферменты, катализирующие деградацию хитина, отщепляя хитоолигосахариды длиной от 2-х до 6-ти N-ацетилглюкозаминовых остатков. Хитиназы подразделяются на два основных семейства. Хитиназы 18 семейства являются широко изученным классом ферментов, представлены практически во всех группах организмов и обладают широким спектром физиологических функций. Грибные продуценты 18 семейства используются в сельском хозяйстве для защиты растений от фитопатогенов и вредителей. Хитиназы 19 менее изучены, однако их потенциал как агента биоконтроля может существенно превосходить хитиназы 18 семьи, так как эволюционно они представляют собой белки иммунного ответа высших растений в ответ на заражение фитопатогенами. Хитиндеградирующая активность хитиназ определяет их практическое применение в качестве защитных агентов против патогенных организмов, таких как грибы и насекомые, что позволяет перейти к биоконтролю распространения фитопатогенов, элиминировав стадию обработки с/х растений мутагенными пестицидами.

Настоящая работа посвящена клонированию и гетерологической экспрессии хитиназы 19 семейства (GH19) из наскомоядных растений *Drosera capensis*, способных эффективно разрушать экзоскелет насекомых.

Из растений, полученных *IV vitro*, были выделены РНК и ДНК, модифицированным СТАВ методом [1]. Последовательность гена хитиназы была восстановлена методом TAIL-PCR [2] и депонирована в базу данных GenBank (MK093978). Длина гена составила 2,443 п.о., включая 3 интрона. Предсказанная открытая рамка считывания состояла из 978 нуклеотидов, и была подтверждена амплификацией кодирующей последовательности с кДНК.

Белок, длиной 325 аминокислотных остатков, кодируемый полученной последовательностью, представляет собой классическую хитиназу 19 семейства имеющую двудоменную структуру и сигнальный пептид на С-концевом участке. Гетерологическая экспрессия хитиназы осуществлялась в клетках *E.coli Arctic Express (DE3)*. Полученный в виде телец включения белок, растворяли в 5М гидрохлориде гуанидина и осуществляли рефолдинг в системе глутатионов [3].

Для полученной гомогенной хитиназы температурный и pH оптимум составляли 55 °C и 4,5 соответственно. В оптимальных условиях активность хитиназы по коллоидному хитину составила 0,36 ед./мг и 0,084 ед./мг по кристаллическому. Неспецифические активности по другим полисахаридам (микрористаллическая целлюлоза, ксилан, карбоксиметилцеллюлоза) не обнаружены.

Таким образом, в работе был осуществлен направленный поиск и клонирование хитиназ 19-ого семейства из *Drosera capensis*. Описаны первичные биохимические характеристики, определены pH и температурные оптимумы. Каталитическая активность полученной хитиназы сопоставима с гомологичными ферментами, выделенными из других растений, а также с бактериальной GH19 из *Streptomyces sp.* Совокупность характеристик полученного фермента демонстрирует актуальность дальнейшего изучения фунгицидных и фитопротекторных свойств, с целью создания биопрепаратов для контроля фитопатогенов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1) Fleischmann A., Heubl G. Overcoming DNA extraction problems from carnivorous plants // An. del Jardín Botánico Madrid. 2009. Vol. 66. №. 2. P. 209–215.
- 2) Jia X., Lin X., Chen J. Linear and exponential TAIL-PCR: a method for efficient and quick amplification of flanking sequences adjacent to Tn5 transposon insertion sites // AMB Express. 2017. Vol. 7. №. 1. P. 195–203.
- 3) Moghadam M., Ganji A., Varasteh A., Falak R., Sankian M. Refolding process of cysteine-rich proteins: Chitinase as a model Rep // Biochem. Mol. Biol. 2015. Vol. 4, No. 1, P. 19–24.