

УДК 632.959

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ НОВОЙ ХИТИНАЗЫ ИЗ ХИЩНЫХ РАСТЕНИЙ *DROSERA CAPENSIS*

И.Г. Синельников^{1*}, И.Н. Зоров^{1,3}, К.С. Болотова², А.П. Сеницын^{1,3},
А.М. Рожкова¹

(¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова»; ³Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; *e-mail: sinelnikov.i@list.ru)

Клонирован новый ген *chi19*, кодирующий хитиназу хищного растения *Drosera capensis*, принадлежащую 19-му семейству гликозилгидролаз. Аминокислотная последовательность транслированного фермента составляет 325 а/к и состоит из четырех функциональных частей: N-концевой сигнальной последовательности, каталитического и хитинсвязывающего доменов, которые были соединены –S–P-линкером. Проведена экспрессия гена *chi19* в системе бактерий *E. coli* в двух формах: с хитинсвязывающим доменом и без него. Для обоих вариантов фермента осуществлен рефолдинг и получены гомогенные растворимые формы. Хитиназы обладают выраженной субстратной специфичностью к кристаллическому хитину, рН-оптимум ферментов находится в диапазоне от 5,0 до 5,5; Т-оптимумы обеих форм ферментов составляли 52–55 °С. Каталитическая активность полноразмерной формы хитиназы составляла 360 ед./г. Удаление хитинсвязывающего домена приводит к уменьшению каталитической активности на 64%.

Ключевые слова: хитиназа, *Drosera capensis*, TAIL-PCR.

Хитин – один из наиболее распространенных в природе полисахаридов (второй после целлюлозы), содержащийся в экзоскелетах насекомых и клеточной стенке грибов и дрожжей. Хитинолитические ферменты, или хитиназы, приобретают все большее значение для прикладных биотехнологических процессов, в частности для контроля фитопатогенов сельскохозяйственных культур. Хитиназы (КФ 3.2.1.14) – обширный класс ферментов, способных разрушать β-1,4-гликозидные связи в макромолекуле хитина с высвобождением хитоолигосахаридов ($n = 2-6$) или свободного N-ацетилглюкозамина.

Хитиназы подразделяются на два основных семейства гликозилгидролаз (GH): GH18 (Chit18) и GH19 (Chit19) [1]. Хитиназы GH18 представлены практически во всех организмах и имеют широкий профиль физиологических функций. Начиная с 60-х годов прошлого века, продуценты хитинолитических ферментов стали привлекать обширное внимание как агенты для контроля фитопатогенов [2]. Продуценты хитиназ GH18, такие как *Bacillus*, *Vibrio*, *Trichoderma*, способны эффективно разрушать клеточную стенку патогена, однако при этом гомогенные хитиназы GH18 не могут значительно ингибировать рост фитопатогенов [3].

Растительные хитиназы GH19 впервые появились у высших растений как белки иммунного ответа, выделяемые при инфицировании фитопатогенными грибами [4], однако позже были обнаружены в бактериях рода *Streptomyces* и некоторых актинобактериях [5]. Хитиназы GH19 имеют весьма консервативное строение и подразделяются на четыре основных класса (I, II, III и IV) в зависимости от наличия хитин-связывающего домена и локализации в клетке [6]. Все хитиназы GH19 проявляют фунгицидную активность, которая, однако, не имеет достоверной корреляции с уровнем каталитической активности [7]. В работе [8] был проведен мутагенез в каталитическом центре (Glu124 и Glu146) хитиназ GH19, выделенных из каштана, что привело к полной потере их каталитической активности. Фунгицидная активность мутантной формы оказалась выше, чем у нативного белка, что подтверждает наличие иного механизма ингибирования роста патогенов, не связанного с гидролизом клеточной стенки. Роль хитинсвязывающего домена в механизме фунгицидной активности хитиназы GH19 также не до конца понятна. На основании вышеизложенного можно предположить, что ингибирование роста фитопатогенов обусловлено связыванием фермента с клеточной стенкой патогена, а не гидролизом последней [7].

По этому вопросу накоплено много данных, однако механизм работы хитиназ GH19 во многом непонятен и требует более глубокого изучения. Особого внимания для прикладных и фундаментальных исследований заслуживают внеклеточные хитиназы хищных растений, которые эволюционно превратились из белков «защиты» в белки «нападения». Некоторые работы по определению функциональных и биохимических свойств были проделаны с ферментами хищных растений рода *Dionaea* [9] и *Nepenthes* [10], однако генетические последовательности хитиназ рода *Drosera* до недавнего времени оставались неизвестными [11].

Таким образом, использование индивидуальных хитиназ GH19 может стать разумной альтернативой как химическим фунгицидам, так и штаммам-продуцентам хитиназ семейства GH18, для осуществления контроля фитопатогенов сельскохозяйственных культур. Выбор в качестве источника хитиназ насекомоядных растений обусловлен в первую очередь наличием в их ферментном комплексе внеклеточных высокоактивных хитиназ, обладающих удовлетворительными операционными характеристиками [7].

Основная цель настоящей работы заключалась в клонировании гена *chi19*, кодирующего хитиназу GH19, экспрессии его в клетках *E. coli* и изучении биохимических свойств нового фермента из насекомоядных растений рода *Drosera*.

Материалы и методы

Подготовка биоматериала

Растения *Drosera capensis* получали из стерильных семян *in vitro* на базальной среде 1/2 MS, дополненной сахарозой (2%) и агаром (0,8%) [12]. Саженьцы были выращены при 25±2 °С. Продолжительность световых суток составляла 16 ч при интенсивности освещения 50 лк. Для работы использовали растения возрастом 8 недель.

Выделение ДНК и РНК

Выделение генетического материала из хищных растений представляет собой нетривиальную задачу [13]. Обилие полифенольных соединений и растворимых полисахаридов сильно осложняет выделение ДНК и РНК. СТАВ-протокол [14] был адаптирован для выделения генетического материала из *Drosera*. В жидком азоте измельчали 100 мг листьев *D. capensis*, после чего порошок переносили в нагретый до 60 °С лизис-буфер (2% СТАВ; 1,5 М NaCl; 2% β-меркаптоэтанол; 4% PVP 15к; 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 10 мМ EDTA (pH 8,0)) и инкубировали

в течение 10 мин. Полученный раствор центрифугировали (14 000 г, 10 мин, 4 °С). Супернатант переносили в чистую пробирку, вносили равный объем хлороформа и перемешивали встряхиванием, после чего центрифугировали (14 000 г, 100 мин, 4 °С). К супернатанту добавляли 3 объема этанола и 0,1 объем 3 М ацетата натрия (pH 4,5). Раствор инкубировали при –80 °С в течение 2 ч и центрифугировали (14 000 г, 30 мин, 4 °С). Супернатант удаляли, а осадок перерастворяли в 200 мкл воды.

Для отделения РНК от ДНК в получившийся раствор вносили 10 М хлорида лития до конечной концентрации 2,5 М, инкубировали при –80 °С в течение 2 ч и центрифугировали (14 000 г, 10 мин, 4 °С). Получившийся осадок РНК трехкратно промывали 70%-м этанолом, растворяли в 50 мкл воды и обрабатывали ДНКазой («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученный раствор очищенной РНК использовали для создания библиотеки кДНК.

Супернатант, полученный после стадии осаждения с хлоридом лития, отделяли и вносили 3 объема этанола и 0,1 объем 3 М ацетата натрия (pH 4,5). Раствор инкубировали при –80 °С в течение 2 ч и центрифугировали (14 000 г, 30 мин, 4 °С). Супернатант удаляли, а осадок трехкратно промывали 70%-м раствором этанола, растворяли в 50 мкл воды и обрабатывали смесью РНКаз А/Т1 («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученный раствор ДНК использовали как матрицу для амплификации полной последовательности гена хитиназы из *D. capensis*.

Реконструкция полной последовательности гена *chit19*

Для реконструкции полной структуры гена необходимо прочтение 3'- и 5'-концевых участков, фланкирующих известную область. Для этого были синтезированы три праймера, отжигающиеся на известный участок гена друг за другом, и два случайных праймера (RTAIL1 и RTAIL2, табл. 1), на концы которых была добавлена короткая последовательность (STAIL, табл. 1).

Метод состоит из трех основных этапов. Первый этап включает в себя две основные стадии: IL (линейную) и IE (экспоненциальную). Для стадии IL, готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей 20 мкл Phusion High-Fidelity PCR Master Mix («Thermo Fisher Scientific», США), 100 пмоль праймера TagChitF1 (или TagChitF3) и 200 нг геномной ДНК. Условия проведения ПЦР-реакции приведе-

Т а б л и ц а 1

Олигонуклеотидные последовательности, используемые для клонирования *chi19* гена

Название	Последовательность
RTAIL1	gacacgtgagcatgca wnnwnhccag
RTAIL2	gacacgtgagcatgca ynnnynvgctc
STAIL	gacacgtgagcatgca
TagChitF1	gtgatgyagctccatcataacttctcaratcttcaacca
TagChitF2	gaacgacaatgcttgctcctgctaataagggttact
TagChitF3	gaaacagcgatatggtttggatgacgcctcaa
TagChitR1	ccttgaggcgtcatcctcaaaacccatcgcgtgtt
TagChitR2	tggtgaagatytgagaagttatgatggagctracatca
TagChitR3	tgtgacttggtgaagttaaggatacatggggcttat
ChitFS	acygcaccmgatgggtccatcgcwtg
ChitRS	gcrctcatccaaaacccatcgmgtgtt
Chit19F	atgaggattactgtcttctgattgctctg
Chit19R	ctaagaaaaaggacgctgattatagca
Chit19lic5'	tactccaatccatgaatgtggctctgaagtcggagggtcac
Chit19lic3'	tatccacccttactgctaagaaaaaggacgctgattatagca
Chit19ΔCBDlic5'	tactccaatccatggggcggatgctcagctccatcataac

ны в табл. 2. Продукт реакции, обогащенный продуктом, содержащим на 5'- или 3'-конце целевой участок гена *chi19*, разбавляли в 100 раз и использовали в качестве матрицы для стадии IЕ. В ПЦР-смесь добавляли случайные праймеры RTAIL1 и RTAIL2, а затем проводили амплификацию. На этой стадии первичный отжиг осуществляли при низкой температуре, что позволяло случайным праймерам эффективно отжигаться на матрице.

На втором этапе стадия линейной амплификации с точностью повторяла стадию II, однако здесь использовали праймер TagChitF2 (или TagChitR2 в случае восстановления 5'-конца). Продукт стадии III разбавляли в 100 раз и использовали как матрицу для дальнейшего проведения реакции. В экспоненциальной стадии IЕ использовали 10 пМ праймера STAIL и 10 пМ праймера TagChitF2 (TagChitR2). Температурный профиль имел две ступени: с высокой температурой отжига (68–63 °С), где происходит отжиг ген-специфичного праймера, и одну с низкой температурой (45 °С), позволяющей отжигаться праймеру STAIL. Данный температурный профиль сдвигает баланс в сторону образования специфического продукта, содержащего последовательность целевого гена. Продукт реакции разбавляется в 10 раз и используется как матрица для III этапа.

На этапе III, состоящем из одной стадии, использовали пару TagChitF3 (TagChitR3) и STAIL (по 10 пМ каждого праймера). На данном этапе происходит обогащение ПЦР-смеси специфичным продуктом, содержащим 3'- или 5'-фрагмент целевого гена и фланкирующую область. Продукты реакции разделяли в агарозном геле и секвенировали по методу Сэнгера.

Выделение кодирующей последовательности *chi19*

Первая цепь кДНК была синтезирована с помощью «Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit» («Thermo Fischer Scientific», США) согласно инструкции производителя. Библиотеку кДНК синтезировали из одного микрограмма тотальной РНК с использованием (dT₁₈) праймера. Для амплифицирования полной кодирующей последовательности *chi19* применяли Chit19lic5' и Chit19lic 3' праймеры (табл. 1).

Экспрессия рекомбинантной хитиназы GH19 в *E. coli* и выделение ее в гомогенной форме

Для определения ферментативной активности белка Chit19 два варианта последовательности были клонированы в вектор *pET-28a* по

методике LIC-клонирования [15]: полноразмерная хитиназа GH19 массой 36 кДа (Chit19) и хитиназа GH19 с удаленным хитинсвязывающим доменом (Chit19 Δ CBD) и линкером массой 28 кДа. Корректность вставки в вектор контролировали секвенированием по Сэнгеру в обоих направлениях. Поскольку кодирующая последовательность имеет неоптимальные для *E. coli* кодоны, экспрессию проводили в штамме *E. coli arctic express* (DE3), дополненном плазмидой *pRARE*, несущей дополнительные тРНК.

Полученными конструкциями трансформировали компетентные *E. coli Arctic express* (DE3) («Agilent», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для оптимизации параметров индукции проводили индукцию при разных концентрациях ИПТГ (0,1–1,0 мМ) и температуре (8–16 °С). Таким образом были получены два штамма-продуцента – *E. coli pET28a_Chit19* и *E. coli pET28a_Chit19 Δ CBD*.

Экспрессию белка Chit19 и Chit19 Δ CBD индуцировали добавлением 0,3 мМ ИПТГ к бактериальной культуре при OD₆₀₀ = 0,6 с последующей инкубацией в течение 24 ч при 10 °С.

Уровень экспрессии и растворимость белка определяли путем Na-ДДС-ПААГ-электрофореза. Тельца включения растворяли в 8 М мочеvine и проводили процедуру рефолдинга в соответствии с протоколом [16]. После рефолдинга рекомбинантные хитиназы выделяли методом металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе («Qiagen», Германия) и отщепляли 6×His-эпитоп путем обработки TEV-протеазой («New England Biolabs», США). Затем проводили концентрирование на спин-колонках с размером пор 10 кДа («GE Healthcare», США).

Определение хитиназной активности

Активность по хитину и хитозану определяли методом [17], основанном на спектрофотометрической детекции выделяемого в ходе гидролиза N-ацетилглюкозамина. К 120 мкл суспензии коллоидного хитина (10 г/л), подогретого до 55 °С, добавляли 90 мкл ацетатного буфера pH 5,0 и 60 мкл ферментного препарата (с концентрацией 1 мг/мл), после чего инкубировали 10 мин и добавляли 900 мкл красящего раствора (0,5 г/л гексацианоферрата(III) калия в 0,5 М Na₂CO₃). Смесь инкубировали 15 мин при 100 °С, центрифугировали и измеряли оптическую плотность при длине волны $\lambda = 400$ нм.

Результаты и их обсуждение

В настоящей работе основное внимание было уделено клонированию полноразмерного гена хитиназы GH19 из росянки *D. capensis*. Как уже упоминалось выше, лишь немногие хитиназы из хищных растений клонированы и депонированы в мировые базы данных. В настоящий момент в NCBI опубликованы две хитиназы из росянок (*D. adelia* (LC037409.1) и *D. rotundifolia* (KU516826.1)), несколько изоформ хитиназы из *Nepenthes* (AY618882.1) и одна хитиназа, выделенная из венериной мухоловки (*Dionaea muscipula*, KT223143.1). Используя стратегию, основанную на гомологии консервативных участков, мы синтезировали вырожденные праймеры ChitFS и ChitRS (табл. 2) для амплификации первичного фрагмента гена *chi19*, кодирующего хитиназу из *D. capensis*.

С помощью вырожденных праймеров удалось клонировать фрагмент гена *chi19* длиной 835 п.н. Для восстановления концевых участков гена было проведено несколько раундов ТАИЛ-ПЦР.

Т а б л и ц а 2

Условия проведения ТАИЛ-ПЦР

Этап	Стадия	Праймеры	Условия ПЦР
I	II	TagChitF1 или TagChitR1	98 °С – 10 с, 62 °С – 5 с, 72 °С – 30 с; 20 циклов
	IE	RTAIL1 RTAIL2	98 °С – 10 с, 25 °С – 5 с, 72 °С – 45 с; 1 цикл 98 °С – 10 с, 60 °С – 7 с, 72 °С – 45 с; 18 циклов
II	III	TagChitF2 или TagChitR2	98 °С – 10 с, 62 °С – 5 с, 72 °С – 45 с; 20 циклов
	III	TagChitF3 или TagChitR3	98 °С – 10 с, 68 °С – 7 с, 72 °С – 45 с, 98 °С – 10 с, 63 °С – 7 с, 72 °С – 45 с, 98 °С – 10 с, 45 °С – 7 с, 72 °С – 45 с; 7 циклов
III	III	TagChitF3 или TagChitR3 и STAIL	98 °С – 10 с, 68 °С – 7 с, 72 °С – 45 с, 98 °С – 10 с, 63 °С – 7 с, 72 °С – 45 с, 98 °С – 10 с, 45 °С – 7 с, 72 °С – 45 с; 13 циклов

Секвенирование полученных продуктов позволило восстановить структуру фрагмента ДНК длиной 2443 п.н. Анализ экзон-интронной структуры фрагмента на сервере AUGUSTUS [18] позволил с высокой достоверностью определить одну открытую рамку считывания, три экзона и два интрона. Общая длина гена составила 1724 п.н., а длина кодирующей последовательности – 978 п.н.

Для подтверждения предсказанной последовательности амплифицировали полную кодирующую последовательность гена *chi19*, используя библиотеку кДНК и праймеры Chit19_F и Chit19_R (табл. 2). Было показано, что клонированная последовательность представляет собой полноразмерный ген *chi19* из *D. capensis*. Ген *chi19* был секвенирован и депонирован в базу данных NCBI под номером MK093978.1.

Анализ аминокислотной последовательности хитиназы GH19 показал, что фермент из *D. capensis* представляет собой классическую хитиназу 19-го семейства гликозилгидролаз, относящуюся к классу I (325 аминокислотных остатков, молекулярная масса 34,2 кДа). Новая хитиназа GH19 состоит из четырех основных элементов: сигнального пептида (20 а.к.), N-концевой хитинсвязывающий домен (40 а.к.), пролин-богатый линкер (18 а.к.) и каталитический домен (247 а.к.) (рис. 1).

Хитинсвязывающий домен хитиназы GH19 имеет высокую гомологию с хитинсвязывающими доменами других растений (>90%), относится к углеводсвязывающим доменам CBD18, содержит

в своей структуре 8 консервативных цистеинов и 2 остатка тирозина, которые участвуют в связывании хитина [19].

Длинный линкер (18 а.к.) между хитинсвязывающим и каталитическим доменами обладает регулярной структурой, состоящей из повторов –S–P–, и имеет три предполагаемых сайта O-гликозилирования.

Каталитический домен имеет высокую гомологию с известными хитиназами GH19 из *Drosera adelaе* (BAR13254.1) и *Drosera rotundifolia* (AMM76171.1,) – 90 и 95% соответственно, что свидетельствует о высокой консервативности данного региона. Оценить влияние имеющихся аминокислотных замен на структуру фермента и его функциональные параметры представляется сложной задачей, так как отсутствуют данные по 3D-структурам хитиназ GH19 из хищных растений, а также данные о их биохимических свойствах. Ближайший гомолог новой хитиназы GH19 с изученными биохимическими свойствами – хитиназа из *Oryza sativa* (2DKV_A, гомология каталитического домена составляет 69%).

Для описания биохимических характеристик и ферментативной активности были получены две формы белка: полноразмерная форма Chit19 и форма с усеченным хитинсвязывающим доменом Chit19ΔCBD. Обе формы хитиназы GH19 имели 6×His-эпитоп на C-конце.

Несмотря на оптимизацию процесса культивирования рекомбинантных штаммов *E. coli*, получение растворимых форм не представля-

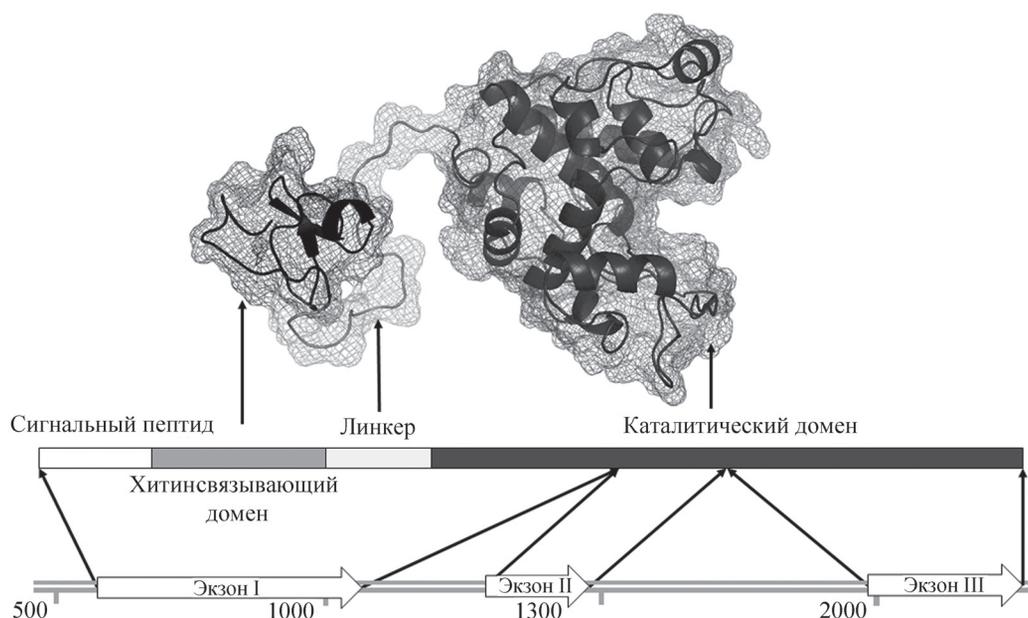


Рис. 1. Структура гена *chi19* и предполагаемая модель кодируемой хитиназы GH19 из *D. capensis*

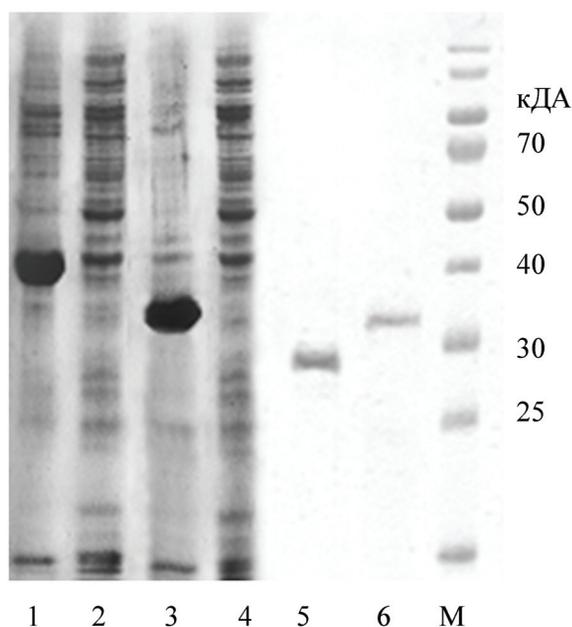


Рис. 2. Na-ДДС-ПААГ-электрофорез нерастворимой (1 и 3) и растворимой (2 и 4) фракций *E. coli pET28a_Chit19* и *E. coli pET28a_Chit19ΔCBD*, и гомогенные ферменты Chit19 (5) и Chit19ΔCBD (6) после рефолдинга

лось возможным. На рис. 2, иллюстрирующем Na-ДДС-ПААГ-электрофорез, отчетливо видны полосы ~35 и ~29 кДа соответственно для полноразмерной хитиназы Chit19 и Chit19ΔCBD в нерастворимой клеточной фракции. После проведения процедуры рефолдинга с последующей аффинной хроматографией выход гомогенного фермента из ИЛ культуры составил 21 мг для Chit19 и 59 мг для Chit19ΔCBD (рис. 2). Аминокислотная последовательность была под-

тверждена MALDI-TOF-масс-спектрометрией. У полученных гомогенных Chit19 и Chit19ΔCBD определяли удельную активность по коллоидному и кристаллическому хитину, хитозану (140 кДа), ксилану, карбоксиметилцеллюлозе и авицелу (табл. 3). На основании полученных данных следует заключить, что Chit19, будучи высокоспецифичным ферментом, имеет удельную активность 0,36 ед./мг по коллоидному хитину, и 0,085 ед./мг по кристаллическому, что превышает активность хитиназы из *Dionaea muscipula* в два раза [9]. Тем не менее, эти показатели относительно низки по сравнению с таковыми для хитиназ GH18, обладающих удельной активностью >20 и 0,6 ед./мг для коллоидного и кристаллического хитинов соответственно [20].

Удаление хитинсвязывающего домена привело к снижению каталитической активности более чем в три раза. Следует отметить, что в аналогичном исследовании хитиназы GH19 из табака [21] удаление хитинсвязывающего домена не привело к изменению каталитической активности, однако существенно уменьшило фунгицидную активность. Такое противоречие часто встречается в работах по изучению влияния хитинсвязывающего домена на активность. Вклад хитинсвязывающего домена в каталитическую активность хитиназов 19-го семейства может различаться, что требует дополнительного исследования в каждом отдельном случае.

Гомогенные хитиназы Chit19 и Chit19ΔCBD проявляли активность в интервале pH от 2 до 8 и имели pH-оптимум 5,5. Для обоих ферментов T-оптимум составлял 55 °C (рис. 3). В сравнении с другими хитиназами исследуемая GH19 имела бо-

Т а б л и ц а 3

Удельные активности Chit19 и Chit19ΔCBD по различным субстратам, ед./г

Субстрат	Удельная активность, ед./г	
	Chit19	Chit19ΔCBD
Коллоидный хитин	360±12	130±12
Кристаллический хитин	84±8	<10
Хитозан	65±7	–
Ксилан*	–	–
Карбоксиметилцеллюлоза*	–	–
Авицел*	–	–

П р и м е ч а н и я: * для измерения активности использовали Na-ацетатный буфер (pH 5,5), $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[S] = 1,0\%$, $[E] = 0,1\text{ мг/мл}$. Ферментативную активность оценивали по скорости образования восстанавливавшихся сахаров в реакционной смеси; «–» – не детектируется.

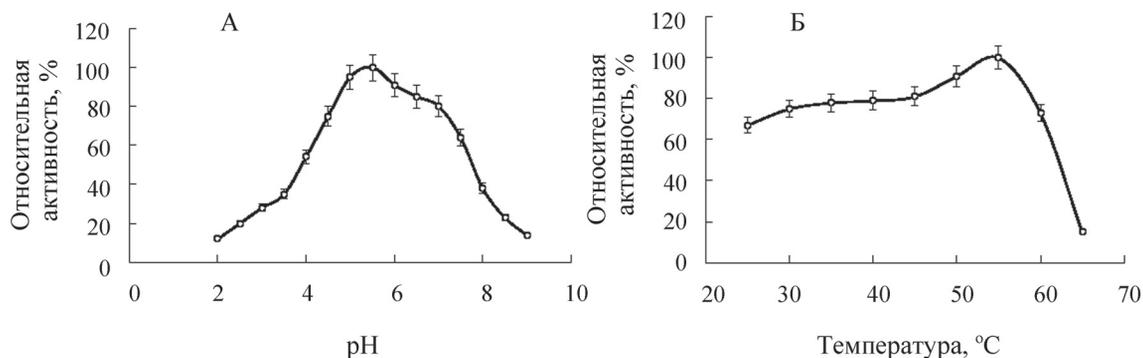


Рис. 3. T-оптимум (А) и pH-оптимум (Б) для Chit19 и Chit19ΔCBD. T-оптимум определялся в Na-ацетатном буфере (pH 5,5) в диапазоне 25–65 °C; измерение pH-оптимума осуществляли при постоянной температуре (T = 55 °C), в универсальном буфере (pH 2,0–9,0)

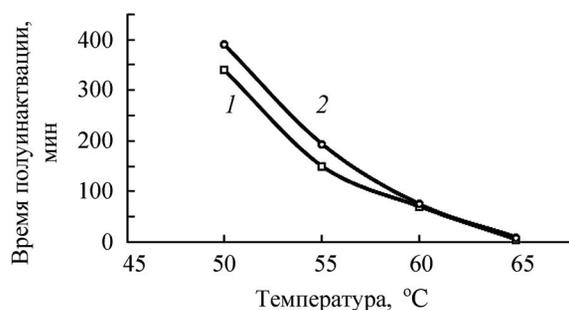


Рис. 4. Термоинактивация Chit19 (1) и Chit19ΔCBD (2) в диапазоне температур 50–65 °C, измеренная по коллоидному хитину ([S] = 1%, [E] = 0,1 мг/мл). Инкубация ферментов осуществлялась в Na-ацетатном буфере (pH 5,5)

лее высокий T-оптимум. Например, для хитиназы GH19 из венериной мухоловки T-оптимум составляет 50 °C [9].

При достижении 65 °C обе формы хитиназы быстро инактивировались – их активность составляла всего 10% от исходной. Удаление хитинсвязывающего домена оказывало стабилизирующее воздействие при термоинактивации (рис. 4), однако не приводило к изменению pH- и T-оптимумов. Время полуинактивации при 50 °C для Chit19ΔCBD возрастало на 13% по сравнению с полноразмерной формой.

Таким образом, в ходе данной работы было реализовано клонирование полноразмерного гена *chi19*, кодирующего хитиназу из 19-го семейства

гликозилгидролаз. Проведен анализ первичной структуры хитиназы и выделены основные функциональные элементы. Дальнейшее изучение хитиназы GH19 будет направлено на повышение эффективности экспрессии фермента, увеличение его растворимости, а также определение фитопротекторных свойств на культурах сельскохозяйственных растений.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (Идентификатор проекта: RFMEFI61620X0128), а также ЦКП «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Конфликта интересов нет.

Дополнительной информации нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oyeleye A., Normi Y.M. // Bioscience Reports. Portland Press Ltd, 2018. Vol. 38. N 4.
- Haran S., Schickleret H., Oppenheimal A., Chet. I. // Mycol. Res. 1995. Vol. 99. N 4. P. 441.
- Aktuganov G.E., Galimzianova N.F., Melent'ev A.I., Kuz'mina L.I. // Mikrobiologiya. Vol. 76. N 4. P. 471.
- Udaya N., Jayanthi M., Sabarinathan R., Kanguane P., Mathew L., Sekar K. // J. Mol. Evol. 2010. Vol. 70. N 5. P. 466.

5. Tanaka J., Fukamizo T., Ohnuma T. // *Glycobiology*. 2017. Vol. 27. N 5. P. 477.
6. Ubhayasekera W., Rawat R., Ho S., Wiweger M., Von Arnold S., Chye M., Mowbray S. // *Plant Mol. Biol.* 2009. Vol. 71, N 3. P. 277.
7. Theis T., Stahl U. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004. Vol. 61. N 4. P. 437
8. Garcia-Casado G., Collada C., Allona I., Casado R., Pacios L., Aragoncillo C., Gomez L. // *Glycobiology*. 1998. Vol. 8. N 10. P. 1021.
9. Paszota P. et al. // *Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteomics*. 2014. Vol. 1844. N 2. P. 374.
10. Eilenberg H., Pnini-Cohen S., Schuster S., Movtchan A., Zilberstein A., Eilenberg H. // *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57. N 11. P. 2775.
11. Jopcik M., Moravcikova J., Matusikova I., Bauer M., Rajnec M., Libantova J. // *Planta*. Springer Verlag, 2017. Vol. 245. N 2. P. 313.
12. Banasiuk R., Kawiak A., Krölicka A. // *Biotechnologia*. 2012. Vol. 93. N 2. P. 87.
13. Fleischmann A., Heubl G. // *An. del Jard. Bot. Madrid*. 2009. Vol. 66. N 2. P. 209.
14. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. // *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997. Vol. 15. N 1. P. 8.
15. Haun R.S., Serventi I.M., Moss J. // *Biotechniques*. 1992. Vol. 13. N 4. P. 515.
16. Moghadam M., Ganji A., Varasteh A., Falak R., Sankian M. // *Reports Biochem. Mol. Biol.* 2015. Vol. 4. N 1. P. 19.
17. Imoto T., Yagishita K. // *Agric. Biol. Chem.* 1971. Vol. 35. N 7. P. 1154.
18. Stanke M., Schöffmann O., Morgenstern B., Waack S. // *BMC Bioinformatics*. 2006. Vol. 7. P. 62.
19. Broekaert W., Mariën W., Terras F., De Bolle M., Proost P., Van Damme J., Dillen L., Claeys M., Rees S., Vanderleyden J. // *Biochemistry*. 1992. Vol. 31. N 17. P. 4308.
20. Fu X, Yan Q, Yang S, Yang X, Guo Y, Jiang Z. // *Biotechnol. Biofuels*. 2014. Vol. 7. N 1. P. 174.
21. Iseli B., Boller T., Neuhaus J.M. // *Plant Physiol. American Society of Plant Biologists*. 1993. Vol. 103. N 1. P. 221.

Поступила в редакцию 10.04.2020

Получена после доработки 12.04.2020

Принята к публикации 20.04.2020

CLONING AND EXPRESSION OF A NEW CHITINASE FROM PREDATIVE PLANTS *DROSERA CAPENSIS*

I.G. Sinelnikov^{1,*}, I.N. Zorov^{1,3}, K.S. Bolotova², A.P. Sinitsyn^{1,3}, A.M. Rozhkova¹

(¹Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences; ²Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov”; ³Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; *e-mail: sinelnikov.i@list.ru)

Novel *chi19* gene encoding the chitinase, belonging to the 19th glycosyl hydrolase family from the predatory plant *Drosera capensis* was cloned and expressed in the *E. coli* bacterial system. The amino acid sequence of the translated enzyme consists of 325 aa divided into four functional parts: N-terminal signal sequence, catalytic and chitin-binding domains that were linked by the -S-P- linker. The *chi19* gene was expressed in two forms: with and without a chitin-binding domain. Refolding was carried out and homogeneous soluble forms were obtained for both variants of the enzyme. Chitinases obtained exhibited predominantly specific activity towards crystalline chitin, with optimal pH level from 5.0 to 5.5 and the optimum temperature in the range of 52 to 55 °C for both forms of the enzyme. The catalytic activity of the full-sized form of chitinase was 360 U/g with 64% decrease of the catalytic activity for the form with chitin-binding domain removed.

Key words: Glycoside hydrolases of family 19, chitinase, *Drosera capensis*, TAIL-PCR.

Сведения об авторах: Синельников Игорь Геннадиевич – мл. науч. сотр., аспирант лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (sinelnikov.i@list.ru); Зоров Иван Никитич – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (inzorov@mail.ru); Болотова Ксения Сергеевна – доцент кафедры биологии, экологии и биотехнологии САФУ имени М.В. Ломоносова, канд. техн. наук, доцент (k.bolotova@ngfu.ru); Синицын Аркадий Пантелеймонович – зав. лаб. физико-химии ферментативной биотрансформации полимеров химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лаб. биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, докт. хим. наук, профессор (apsinitsyn@gmail.com); Рожкова Александра Михайловна – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (amrojtkova@yahoo.com).