

КЛОНИРОВАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ κДНК ХИТИНАЗЫ ИЗ МОЛИ – МИНЕРА ЛИСТЬЕВ ЯБЛОЧНОГО ДЕРЕВА (*Lithocolletis ringoniella*)

© 2015 Кс.-Дж. Фан*, У.-Кс. Май, Х. Рен,
Ч. Жанг, Я. Лай, Кс.-Кс. Ксиан

Тайюаньский технологический университет,
Колледж химии и химической инженерии, Департамент биологической
и фармацевтической инженерии, Китай; факс: +86(351)601-8534,
электронная почта: fxjbio@163.com

Поступила в редакцию 21.07.14
После доработки 19.09.14

Хитиназа насекомых играет важную роль в катаболизме хитина, связанном с перевариванием и линькой насекомого в период его развития. В настоящей работе проведено клонирование κДНК хитиназы (*LrCht5*) из минера яблочного листа (*Lithocolletis ringoniella*) и определены аминокислотная последовательность и свойства белка. Длина κДНК хитиназы *L. ringoniella* насчитывала 2136 п.о. при открытой рамке считывания, равной 1737 п.о., и кодировала белок, состоящий из 579 а.о. с расчетной мол. массой 64,4 кДа и *pI* 5,49. В каталитическом домене находится несколько сайтов фосфорилирования и гликозилирования. Рекомбинантный *LrCht5* экспрессировали в линиях клеток. Sf9 и *LrCht5*, экспрессированные в клетках насекомых, обладали хитинолитической активностью. *LrCht5* был наиболее стабилен при pH 6 и 45°. Результаты настоящей работы могут быть использованы для разработки новых, более эффективных, синтетических ингибиторов хитиназы с перспективой их применения в качестве биоинсектицидов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Lithocolletis ringoniella*, хитиназа, RACE-ПЦР, ферментативная активность.

Хитин является нерастворимым полисахаридным полимером, образованным остатками β-(1,4)-*N*-ацетилглюкозамина; он жизненно необходим для образования кутикулы насекомого и перитрофной мембраны (peritrophic membrane – РМ) [1]. Во время роста и развития насекомого кутикула и перитрофная мембрана подвергаются протеолизу и обновлению, что обеспечивает его рост, созревание и восстановление [2–3]. Деградирующие хитин ферменты принимают участие в сбрасывании старой кутикулы и обновлении перитрофной мембраны [4]. Расщепляющая на концах хитиназа и расщепляющая внутренние связи β-*N*-ацетилглюкозаминидаза являются двумя основными ферментами, участвующими в деградации хитина. Основные функции хитиназ связаны с их участием в переваривании, процессе линьки членистоногих, защите и патогенности, в связи с тем, что они осуществляют гидролиз β-1,4-связей с хитином с образованием низкомолекулярных продуктов

[5–6]. Хитиназы насекомых образуют семейство из 18 гликогидролаз в соответствии с их консервативной аминокислотной последовательностью, несколькими консервативными мотивами и мультидоменной структурой [3]. Значимость хитина для развития насекомых вызвала большой интерес к хитиназам как потенциальным мишеням для разработки молекул инсектицидов для защиты урожаев и лесов от насекомых-вредителей [7].

Работы, посвященные изучению хитиназ насекомых на белковом уровне, публикуются, начиная с 1970-х гг. Первая полноцепочечная κДНК, кодирующая хитиназу насекомых, была выделена из рогатой гусеницы табачного листа (*Manduca sexta*) [8]. Затем были клонированы дюжины кодирующих хитиназы κДНК из многих видов насекомых, включая мух, молей и жуков [9–12]. Доступность информации о полных геномах насекомых облегчила поиск сходства их последовательностей, что ускорило проведение исследований хитиназ насекомых на генетическом уровне [13].

Хитиназа была экспрессирована в трансгенных растениях и рекомбинантных бакуловирусах и было показано ее влияние на контроль за

Принятые сокращения: RACE – быстрая амплификация концов κДНК; *LrCht* – хитиназа из *Lithocolletis ringoniella*; п.о. – пар оснований; а.о. – аминокислотные остатки.

* Адресат для корреспонденции.

вредителями [14–16]. Например, Маккаферти и соавт. в 2006 г. сообщили, что трансгенные растения папайи, в клетках которых экспрессируется белок хитиназа из *M. sexta*, более устойчивы к паучьим клещам [17]. Хитиназы насекомых также могут быть использованы для облегчения распространения рекомбинантных бакуловирусов путем переваривания хитин-содержащих препятствий. Гопалакришнан и соавт. показали, что значение LT_{50} насекомых, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом AcMNPV-*chi*, было на 18–20 ч меньше в сравнении с насекомыми, инфицированными вирусом дикого типа [14], в этом случае инсерция хитиназы могла бы повысить эффективность действия бакуловируса. Исследования, выполненные в нашей лаборатории, также показали, что хитиназа из *M. sexta* может быть использована для усиления инсектицидной активности рекомбинантного бакуловируса [18].

Чтобы еще повысить эффективность хитиназ насекомых как потенциальных инсектицидов, необходимо узнать больше об этих ферментах [19–20]. В настоящей работе было проведено клонирование кДНК, кодирующей активную хитиназу из *Lithocolletis ringoniella* (Gracilariidae), вредителя фруктов. Информация по хитиназам этого семейства практически отсутствует в отличие от других семейств молей. Мы использовали бакуловирусную векторную систему экспрессии и получили рекомбинантную хитиназу из *L. ringoniella* с удельной активностью, сравнимой с активностью хитиназы, экспрессированной в *E. coli*. Далее мы приводим полученные данные о хитиназе из *L. ringoniella*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание насекомых и сбор тканей. Яйца минера яблочных листьев (*L. ringoniella*) собирали в яблочных садах неподалеку от г. Юнчен в провинции Шанкси (Китай). Яйца (молочного цвета) находились на обратной стороне листьев, они были посажены на специальную диету, приобретенную в RIFE (Китайская лесная академия), при 26° и световом режиме 12 ч – на свету, 12 ч – в темноте. Подвергнутые анестезии личинки были разрезаны в ледяном солевом растворе, содержащем 0,75%-ный NaCl и кутикулы получали из организмов, находящихся на стадии предкуколки. Ткани промывали для удаления загрязнений и замораживали в жидком азоте для дальнейшего использования.

Получение РНК и синтез кДНК. РНК получали из кутикул личинок на стадии предкуколки, используя реагент RNAliso Plus («TaKaRa», Китай),

согласно инструкциям производителя. Проверку осуществляли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле и количество белка определяли на приборе Thermo Scientific Multiskan GO («Thermo Fisher Scientific», США). кДНК первой цепи синтезировали с использованием 1 мкг общей РНК с помощью набора TIANScript™ RT Kit («Tiangen Biotech Co.», Китай).

Аmplификация фрагмента кДНК. Вырожденные праймеры (таблица) были сконструированы согласно консервативным аминокислотным последовательностям DWEYPG и WAIDMD из каталитического участка хитиназы насекомых. ПЦР проводили в следующих условиях: исходная денатурация при 95° 2 мин, затем 32 цикла при 95° 30 с, 50° 1 мин и при 72° 45 с и заключительной денатурации при 72° 10 мин. Продукт амплификации получали путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле, окрашивали этидий бромидом и очищали с использованием набора Gel Extraction Kit («Omega Bio-Tek», США). Очищенный фрагмент подвергали дополнительному клонированию в pEASY-Blunt векторе с использованием набора pEASY-Blunt cloning kit («TransGen Biotech Co.», Китай). Позитивные клоны характеризовали с помощью ПЦР и некоторые из этих клонов секвенировали в «Sangon» (Китай).

Быстрая амплификация концов кДНК (RACE). Последовательность 3'-концевого участка *LrCht5* была амплифицирована с использованием набора 3'-RACE kit («Life Technology», Китай) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве матрицы для 3'-RACE ПЦР синтез первой цепи кДНК был инициирован на поли(А)-содержащем хвосте мРНК с использованием адаптора 3'-конца праймера (таблица). В 3'-RACE ПЦР был использован специфичный праймер GSP1 (таблица) (который отжигается с консервативным участком) и универсальный амплификационный праймер UAP (таблица). ПЦР осуществляли при следующих условиях: исходная денатурация при 95° 1 мин, 25 циклов при 95° 1 мин, 55° 1 мин, 72° 2 мин и заключительной элонгации при 72° 10 мин. Вложенная ПЦР была проведена с использованием UAP и GSP2 (на 47 п.о. ниже GSP1), с использованием продукта ПЦР, полученного в результате первой амплификации в качестве матрицы.

Для амплификации 5'-концевой последовательности гена *LrCht5* был использован ген-специфичный праймер (GSP – gene specific primer) (таблица) как праймер обратной транскрипции. До начала 5'-RACE амплификации фрагмент поли(С) был лигирован к 3'-концу кДНК гена *LrCht5* с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы («TaKaRa», Китай). кДНК с

Праймеры, использованные для амплификации *LrCht5*

Праймер	Последовательность (5' → 3')	Примечание
Вырожденный F	GAYTGGGAGTACCCCHGG	консервативный участок
Вырожденный R	TCCATRTCRA TRGCCCA	консервативный участок
3'-адаптор	GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC (T) ₁₈	3'-race транскрипция
UAP	GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC	3'-race амплификация
GSP1	TGGCGATCCTGCTCCGTACAC	3'-race амплификация
GSP2	ACAAAGAAGGCTCAGGCTG	3'-race амплификация
GSP	TCCTTGATCCAGTTCATCTTGATCT	5'-race транскрипция
5'-адаптор	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG(C) ₁₆	5'-race амплификация
GSP3	TCGTACGACATCACGTGGATAGC	5'-race амплификация
LrCht5F	ATGAGAGTGATACTAGCGACGTTG	LrCht5 ORF
LrCht5R	CAGTTTAGGGCTCGCAGTCACTAC	LrCht5 ORF
P1Cht5F	CAGGA <u>AATTC</u> ATGAGAGTGATACTAGCGACGTTGG	LrCht5 ORF прокариотической и эукариотической экспрессии
P2Cht5R	TACA <u>AGCTTT</u> TAGGGCTCGCAGTCACTACGGTC	LrCht5 ORF прокариотической экспрессии
P3Cht5R	TACCTGCAGTTAATGATGATGATGATGATGGGGC- TCGCAGTCACTACGGT	LrCht5 ORF эукариотической экспрессии

Примечание. Сайты рестрикции подчеркнуты одной линией, 6 × His-tag отмечен двойным подчеркиванием. Символы «Y», «R» и «N» в вырожденных праймерах означают C/T, A/G и A/C/T соответственно.

прикрепленным поли(C) хвостом затем была амплифицирована с помощью ПЦП с использованием сокращенного заякоривающего праймера 5'-адаптора и GSP3, находящимися на 410 п.о. выше GSP. Оба продукта 3'-RACE и 5'-RACE были очищены и секвенированы.

Сквозная амплификация полной кодирующей последовательности *LrCht5*. После определения 3'- и 5'-концевых последовательностей *LrCht5* праймеры *LrCht5F* и *LrCht5R* были использованы для амплификации полной открытой рамки считывания с помощью реакции ПЦП: исходная денатурация при 95° 3 мин, 32 цикла при 95° 30 с, 55° 1 мин, 72° 2 мин и конечной денатурации при 72° 10 мин. Для дальнейшего изучения *LrCht5* продукт ПЦП был клонирован в вектор pEASY-Blunt («TransGen Biotech», Китай) и трансфицирован в компетентные клетки *E. coli*. Положительные клоны были охарактеризованы и рекомбинантный вектор, содержащий *LrCht5*, был проверен секвенированием с помощью Invitrogen («Life Technology», Китай).

Анализ последовательности и построение филогенетического дерева. Полная нуклеотидная последовательность гена *LrCht5* была введена в базу данных Seqman на основе информации по трем фрагментам RACE. Сайты O-гликозилирования и сайты фосфорилирования в рассчитанной аминокислотной последовательности были предсказаны с помощью серверов DictyOGlyc1.1 и NetPhos 2.0 соответственно. Наличие и место расположения сайтов расщепления сигнального пептида обнаруживали с помощью сервера SignalP 4.0, в то время как функциональный домен *LrCht5* был проанализирован с помощью ExPASy. Вторичная структура и трехмерная структура *LrCht5* были предсказаны с помощью серверов Anthergo и SWISS-MODEL соответственно. Множественное выравнивание последовательностей и филогенетический анализ проводили с использованием программ ClustalW2 и MEGA 4.0 соответственно.

Экспрессия белка *LrCht5* в *E. coli* и его очистка. Полная открытая рамка считывания (ORF –

open reading frame) *LrCht5* была амплифицирована с помощью праймеров P1*Cht5*F и P2*Cht5*R (таблица). Были сконструированы четыре вектора экспрессии (pMAL-*LrCht5*, pET32a-*LrCht5*, pET28a-*LrCht5* и pRSET-*LrCht5*) и затем трансформированы в *E. coli* (штамм BL21). Очистку белка осуществляли путем его нанесения на колонку с амилозой. Связавшийся белок элюировали буфером, содержащим 10 мМ мальтозу. Очищенный белок (pMAL-*LrCht5*) был проанализирован с помощью SDS-ПААГ и Вестерн-блоттинга с использованием антител против белка, связывающего мальтозу (maltose binding protein – MBP).

Экспрессия *LrCht5* в бакуловирусной системе и его очистка. Бакуловирусная система экспрессии Vac-to-Vac и линия клеток насекомых Sf9 были использованы для эукариотической экспрессии *LrCht5*. ORF *LrCht5* была получена с помощью ПЦР с использованием P1*Cht5*F и P3*Cht5*R (лигированных с 6 × His tag и сайтом рестрикции). Продукт ПЦР и донорную pFast-VacDual плазмиду («Invitrogen», США) подвергали перевариванию ферментами рестрикции *Eco*RI и *Pst*I («Fermentas», Литва) (16 ч, 37°). После электрофореза в 1%-ном агарозном геле конечные продукты были экстрагированы из геля с помощью набора для очистки ДНК («Bioneer», Корея). Очищенные двухцепочечные продукты были лигированы с использованием ДНК лигазы из бактериофага T4 (16°, в течение ночи). Конструкт далее был трансформирован в компетентный штамм *E. coli* DH10В для получения трансферного вектора Vacmid-*LrCht5*. Рекомбинантный трансферный вектор был подвергнут проверке с использованием праймеров pUC/M13 (+) и pUC/M13 (–) для дальнейшего осуществления ПЦР амплификации. Проверенный рекомбинантный трансферный вектор был трансфицирован в клетки Sf9 с использованием реагента инфицирования бакуловирусом («Life Technology», Китай). Клетки были посеяны в 75 см² планшеты и выращивались в культуральной среде TNM-FH. После достижения плотности клеток значения (80%) были получены рекомбинантные бакуловирусы с высоким титром (10⁸ pfu/мл). Клетки Sf9 инкубировали при 27° в течение 3 дней. Культуральную среду собирали и определяли уровень экспрессии *LrCht5* с помощью SDS-ПААГ-электрофореза (12%-ный ПААГ) с последующим окрашиванием Coomassie blue.

Среду собирали путем центрифугирования при 9000 g в течение 20 мин. И полученный супернатант подвергали диализу против 20 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 8, при 4° в течение ночи для удаления телец включения. Реак-

ционную смесь наносили на колонку объемом 1 мл с Ni-NTA, которую промывали 10 мл промывочного буфера, содержащего 50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl. Связавшиеся белки были элюированы градиентом имидазола 20–500 мМ. Белки *LrCht5* подвергались разделению и очистке. SDS-ПААГ-электрофорез проводили в 5%-ном концентрирующем и 12%-ном разделяющем геле.

Профили активности и стабильности в зависимости от pH. Влияние pH на активность *LrCht5* определяли с использованием олигосахаридного субстрата, 4-метилумбеллиферил β-N, N', N''-триацетилчито-триозид (MU-(GlcNAc)₃, «Sigma», США). Определение MU-(GlcNAc)₃ проводили по работе Холлиса с соавт. (1997). Согласно методике, белок инкубировали с 20 мкМ MU-(GlcNAc)₃ и 0,1 М универсального буфера, pH 3–10, при 37° в течение 15 мин. Высвобождающийся метилумбеллиферон (MU – methylumbelliferon) разводили 0,15 М глицин-NaOH-буфером, pH 10,5, и измеряли на флуоресцентном спектрофотометре (F-2700, «Hitachi High-Technologies», Япония) при возбуждающей длине волны 360 нм и длине волны эмиссии 450 нм. Стандартная кривая для MU строилась таким образом, чтобы превратить интенсивность флуоресценции в количество нмоль образуемого продукта. Активность фермента выражали в нмоль/мкг/мин. Чтобы определить стабильность *LrCht5* в зависимости от значения pH среды, экспрессированный белок сначала инкубировали в 0,1 М универсальном буфере с pH от 3 до 10 [21] при 37° в течение 1 ч; следующие этапы были такими же, как в случае определения профиля активности фермента в зависимости от значения pH (см. выше).

Температурная зависимость активности *LrCht5*. Влияние температуры на активность фермента определяли в универсальном буфере, оптимальном значении pH, MU-(GlcNAc)₃ в качестве субстрата и инкубации в течение 15 мин. Чтобы измерить температурную стабильность *LrCht5*, экспрессированный белок сначала инкубировали в универсальном буфере при различных значениях температуры (от 30 до 60°) при pH 6 в течение 1 ч; последующие этапы были описаны выше для измерения профиля температурной зависимости активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование полной цепи кДНК *LrCht5*. Консервативный участок размером 695 п.о. в *LrCht5* имеет обширную идентичность с *Helicoverpa armigera* и другими хитиназами молей. Продукт 3'-RACE (1200 п.о.) и продукт 5'-RACE (700 п.о.)

демонстрировали высокую идентичность с другими хитиназами насекомых. Полная длина кДНК LrCht5 включает в себя 25 п.о. 5'-UTR, 1737 п.о. ORF и 374 п.о. 3'-UTR (рис. 1). Полиаденилированная сигнальная последовательность (AATAAA) была вставлена 11 п.о. выше полиА-хвоста. Последовательность была отправлена в NCBI (№ доступа JN607321).

Биоинформатический анализ LrCht5. кДНК LrCht5 кодирует синтез полипептида, содержащего 579 а.о., с предсказанной мол. массой 64,4 кДа и значением pI 5,49. С помощью сервера SignalP 4.0 определен сигнальный пептид, содержащий 21 остаток, отщепляющийся при разрыве пептидной связи между остатками Asp21 и Ser22. Мы идентифицировали 5 сайтов O-гликозилирования и 37 сайтов фосфорилирования с помощью серверов DictyOGlyc1.1 и the NetPhos 2.0 соответственно. Анализ, проведенный с использованием программы Antherpro, позволил предположить, что вторичная структура LrCht5 содержит 28% α -спиральной структуры, 21% β -складча-

тых структур, 29% структур типа «поворот» и 22% «случайного клубка». Аминокислотная последовательность LrCht5 была отправлена для обработки программой SWISS-MODEL [22] и полученные результаты говорят о том, что предсказанная 3D-структура LrCht5 представляет собой классический (β/a) бочонок из 8 ТИМ свернутых структур, который также обнаруживается у всех 18 гликозилгидролаз этого семейства (рис. 2, см. цветную вклейку). Анализ с помощью сервера ExPASy выявил хитин-связывающий участок, состоящий из 68 аминокислотных остатков, и характерный мотив для этого семейства 18 гликозилгидролаз, FDGLDLDEWEYP. Подробное описание LrCht5 приведено на рис. 3 (см. цветную вклейку).

Сравнение полной нуклеотидной последовательности показало, что LrCht5 демонстрирует более 75% идентичности с хитиназами насекомых семейства молей и 99% идентичности с насекомыми из ночных бабочек. Построенное на сравнении аминокислотных последовательностей филогенетическое дерево LrCht5 показало, что *L. ringoniella* более всего близка к *H. armigera* и находится на расстоянии от насекомых, не относящихся к молям (рис. 4).

Экспрессия LrCht5 в *E. coli* и его очистка. Предварительные результаты SDS-ПААГ-электрофореза подтверждают экспрессию смешанного белка (~110 кДа) в *E. coli* (рис. 5, см. цветную вклейку). Смешанный белок обнаруживается anti-MBP tag моноклональными антителами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что мы экспрессировали MBP-LrCht5 в клетках *E. coli* (рис. 5).

Электрофоретический анализ хитиназы из *L. ringoniella*, экспрессируемой рекомбинантными бакуловирусами. Мы сконструировали рекомбинантный бакуловирус (AcMNPV-LrCht5) с $6 \times His$ -tag, содержащий гетерологичный фрагмент ДНК длиной в 1700 п.о., под контролем промотора гена полигедрина. После инфицирования клеток Sf9 рекомбинантным бакуловирусом происходит секреция в культуральную среду белка с мол. массой ~70 кДа. С использованием SDS-ПААГ-электрофореза грубого лизата мы выявили основную белковую полосу, соответствующую мол. массе ~70 кДа (рис. 5).

Оптимальный pH и стабильность препарата белка с использованием олигосахаридного субстрата. Была определена pH-зависимость активности хитиназы в диапазоне значений pH от 3 до 10 с использованием олигосахаридного субстрата MU-(GlcNAc)₃. Подсчет относительной активности фермента проводили путем трех независимых измерений. Согласно полученным результатам, оптимальный pH для LrCht5 равен 6, а активность

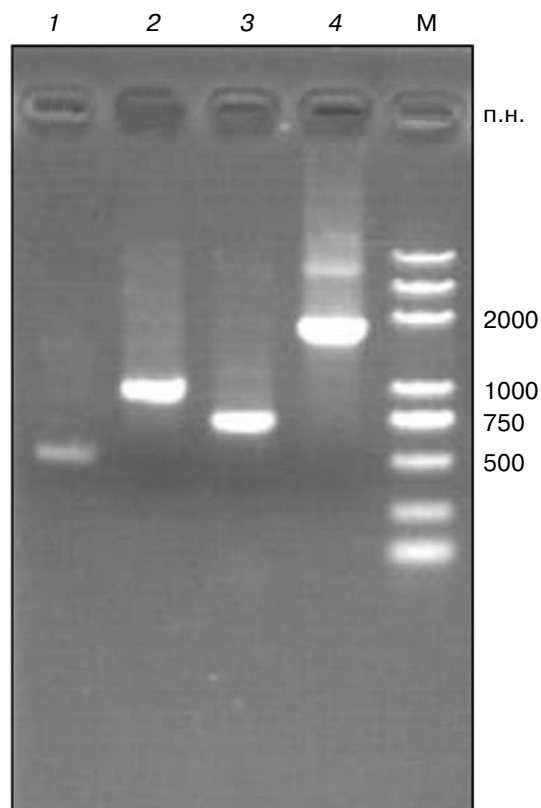


Рис. 1. ПЦР-продукт LrCht5 с помощью RACE. Дорожки: 1 – консервативный частичный домен; 2 – продукты 3'-racc; 3 – продукты 5'-racc; 4 – ORF кДНК LrCht5; M – маркер DL2000

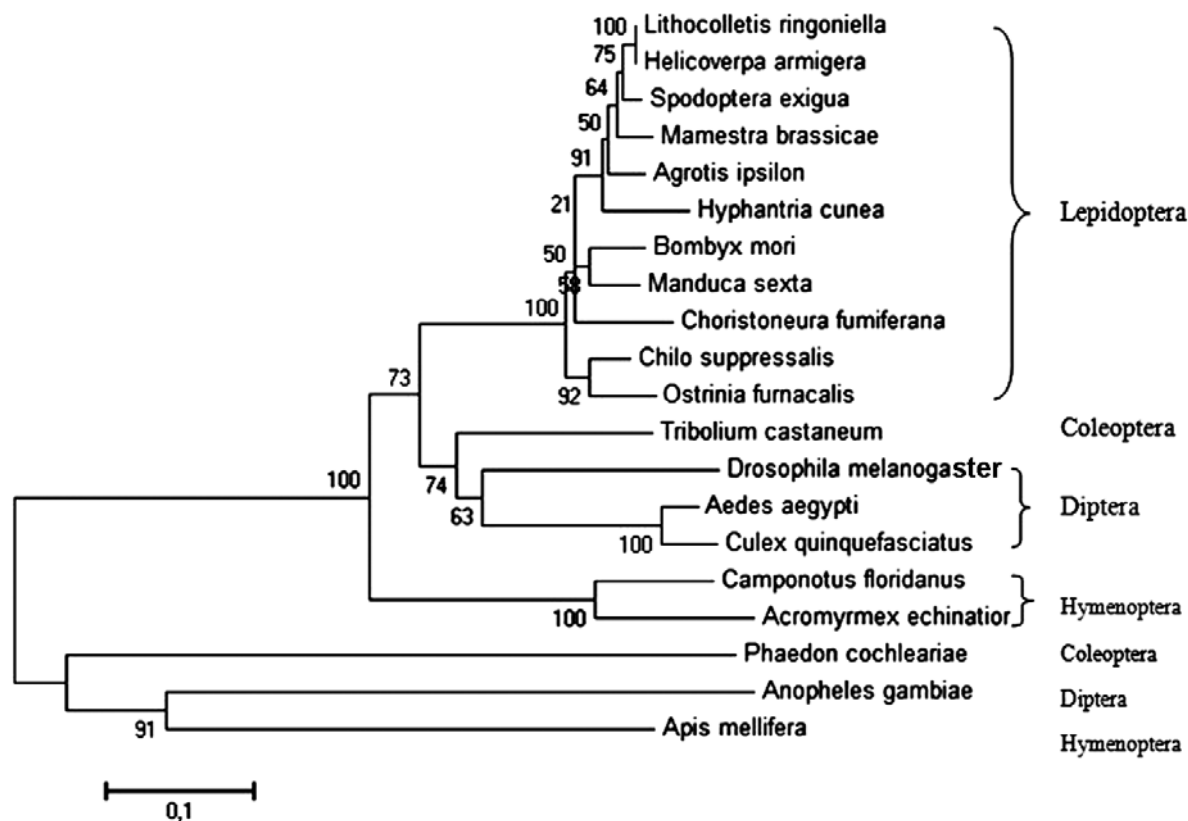


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе 20 хитиназ насекомых. Цифры в узлах дерева означают значения бутстрэпа, рассчитанные на 1000 повторов. Деление на шкале означает филогенетическое расстояние, равное 0,05 аминокислотных замен на один сайт. *L. ringoniella* (JN607321), *H. armigera* (AY325496), *S. exigua* (GU371868), *M. brassicae* (FJ436415), *A. ipsilon* (FJ899540), *H. cunea* (U86877), *B. mori* (U86876), *M. sexta* (U02270), *C. fumiferana* (AY098731), *C. suppressalis* (AY705930), *O. furnacalis* (AY726548), *T. castaneum* (NM001039435), *D. melanogaster* (AY061553), *A. aegypti* (AF026491), *C. quinquefasciatus* (XM001863349), *C. floridanus* (GL439655), *A. echinator* (GL888237), *P. cochleariae* (Y18011), *A. gambiae* (AF008575), *A. mellifera* (XM623992)

фермента резко снижалась при других значениях pH (рис. 6).

Влияние значения pH среды на стабильность хитиназы было исследовано в диапазоне значений pH от 3 до 10. Наибольшая стабильность фермента наблюдалась при pH 6; фермент утрачивал активность при значениях pH ниже 4 после инкубации в течение 1 ч (рис. 6).

Профили зависимости активности и стабильности фермента от температуры. Влияние температуры на активность хитиназы было изучено с использованием олигосахаридного субстрата MU-(GlcNAc)₃, в диапазоне температур 30–60°, при оптимальном значении pH 6. Влияние температуры на активность фермента рассчитывали после инкубации в течение 15 мин. Как показано на рис. 7, температурный оптимум фермента равен ~45° и активность фермента резко падает при повышении температуры выше 50°, и относительная активность фермента была равна 23% при 60°.

Измерение зависимости стабильности LrCht5 от температуры проводили после выдерживания белка при определенной температуре от 30 до 60° в течение 1 ч (рис. 7). LrCht5 стабилен в диапазоне температур между 30 и 40°. Его стабильность резко падает при температурах от 40 до 50°; после инкубации в течение 1 ч при 45° относительная активность фермента была равна 46,3%. При температуре выше 55° фермент практически теряет активность.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Так как геном *L. ringoniella* до сих пор не секвенирован, в настоящей работе проведен поиск кДНК, кодирующей хитиназу на основе опубликованных данных по генам хитиназы других насекомых семейства молей. Хотя, в целом, хитиназы насекомых являются высококонсерва-

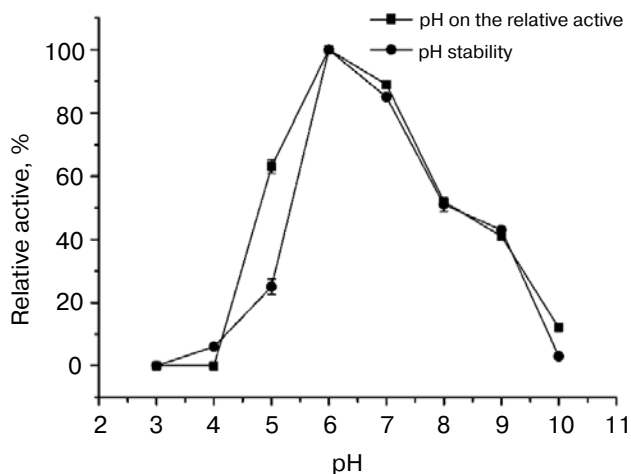


Рис. 6. Влияние pH на относительную активность LrCht5; pH-зависимая стабильность очищенного LrCht5; значения стандартного отклонения (s.d.) показаны вертикальными столбиками

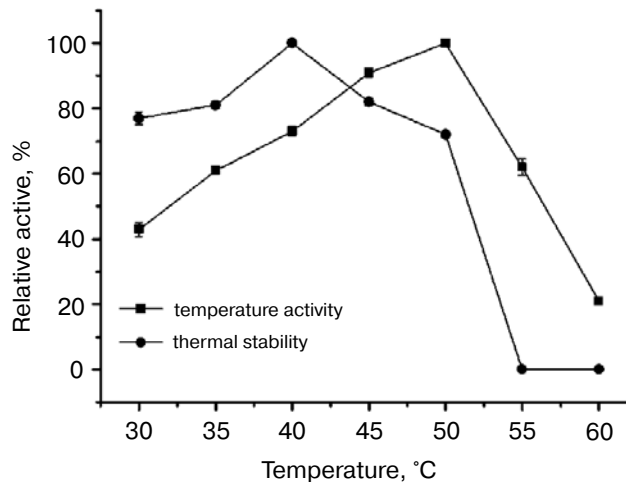


Рис. 7. Влияние температуры на активность LrCht5; зависимость стабильности очищенного LrCht5 от температуры; величины стандартного отклонения (s.d.) показаны вертикальными столбиками

тивными белками, линкерные участки обладают наиболее дивергентными аминокислотными последовательностями среди хитиназ молей, в то время как каталитические домены обладают большим сходством. Выравнивание белков с помощью программы Protein BLAST 20 хитиназ насекомых на сайте NCBI привело к обнаружению двух высококонсервативных мотивов. Это обстоятельство позволило нам клонировать центральный фрагмент и затем последовательно удлинить его в обоих направлениях через RACE-ПЦР.

кДНК *LrCht5* обладает большим сходством с другими хитиназами молей (рис. 3). *LrCht5* на основе присутствия двух консенсусных участков в каталитическом домене, так же как и другие хитиназы насекомых, может быть отнесен к семейству 18 гликозилгидролаз. В настоящее время хитиназы насекомых и хитиназо-подобные белки по результатам филогенетического анализа их каталитического домена подразделяются на 8 групп [23]. Хитиназа 5 (Cht5) среди этих хитиназ и подобных хитиназе белков входит в 5 группу, поэтому ген, кодирующий этот белок, был назван как LrCht5. Был выполнен рентгеноструктурный анализ хитиназ семейства 18 из различных растений, микроорганизмов и двух видов насекомых, *Drosophila melanogaster* и *Ostrinia furnacalis* [24–28]. Рассчитанная трехмерная структура LrCht5 содержит $(\beta/\alpha)_8$ ТИМ бочонок, который состоит из 8 цепей β -бочонков, расположенных внутри, и 8 α -спиральных

участков, находящихся на внешней стороне этой структуры (рис. 2). Эти структуры являются двумя классическими структурными мотивами, характерными именно для семейства 18 гликозилгидролаз. Более того, аминокислотная последовательность LrCht5 показывает 90%-ную идентичность с последовательностью OfCht5 (код PDB: 3w4rA), которая была использована в данной работе в качестве матрицы для моделирования трехмерной структуры [28]. Консервативная последовательность (FDGLDL-DWEYP) находится в непосредственной близости к субстрат-связывающему карману. Поэтому возможно, что Asp140 и Gly141 позволяют осуществлять нерегулярный контакт между N-концевыми участками структур $\beta 3$ и $\beta 4$ [25] (рис. 2).

Система Vas-to-Vas применена нами для конструкции рекомбинантного бакуловируса, который был затем использован для трансфекции и последующей экспрессии рекомбинантного белка в клетках Sf9. SDS-ПААГ-анализ клеточной суспензии показал, что уровень экспрессии рекомбинантной хитиназы (1,3 мг/л) в клетках Sf9 был ниже по сравнению с клетками *E. coli* (1,8 мг/л). Бактериальные клетки продуцировали белок, как в виде телец включения, так и растворимой, но неактивной форме. Оптимизация условий экспрессии или использование 4 различных клеток-хозяев не приводило к экспрессии активного белка. LrCht5 содержит 13 остатков цистеина, которые могут образовывать случайным образом несколько дисульфидных свя-

зей во время их экспрессии в клетках бактерий. Следовательно, полученные нами результаты, по-видимому, отражают несоответствующую конформацию рекомбинантного белка из-за низкой способности бактериальных клеток образовывать соответствующие дисульфидные связи. Хотя нормальные штаммы содержат компоненты тиоредоксинредуктазного пути, которые могут участвовать в образовании дисульфидных связей, они обычно неспособны корректировать случайно образующиеся дисульфидные связи. Значение мол. массы рекомбинантной хитиназы (~70 кДа), продуцируемой клетками насекомых, превышал значения, рассчитанные для белка, кодируемого открытой рамкой считывания клона хитиназы (64,4 кДа)

или в случае хитиназы, экспрессированной в *E. coli*. Это означает, что LrCht5 подвергается посттрансляционной модификации. Рассматривая все это в совокупности, мы считаем, что система экспрессии с использованием бакуловирусов производит белки с очень сходной трехмерной структурой со сравнимыми посттрансляционными модификациями, отличающимися их от соответствующих нативных форм [29].

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального фонда естественных наук Китая (грант 31101490) и Национального научного фонда молодых ученых провинции Шанкси, Китай (грант 2010021031-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khoushab, F., and Yamabhai, M. (2010) Chitin research revisited, *Mar. Drugs*, **8**, 1988–2012.
2. Zakariassen, H., Klemetsen, L., Sakuda, S., Vaaje, K.G., Varum, K.M., Sorlie, M., and Eijsink, V.G. (2010) Effect of enzyme processivity on the efficacy of a competitive chitinase inhibitor, *Carbohydr. Polymers*, **82**, 779–785.
3. Zhang, J.Z., Zhang, X., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K.J., Ma, E.B., and Zhu, K.Y. (2011) Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*), *PLoS One*, **6**, e19899.
4. Fukamizo, T., and Kramer, K.J. (1985) Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid, *Insect Biochem.*, **15**, 141–145.
5. Santos, I.S., Da, C.M., Machado, O.L., and Gomes, V.M. (2004) A chitinase from *Achenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterisation and immunolocalisation, *Plant Sci.*, **167**, 1203–1210.
6. Wang, S., Shao, B., Fu, H., and Rao, P. (2009) Isolation of a thermostable legume chitinase and study on the antifungal activity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 313–321.
7. Kuddus, M., and Ahmad, I.Z. (2013) Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **11**, 39–46.
8. Kramer, K.J., Corpuz, L., Choi, H.K., and Muthukrishnan, S. (1993) Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **11**, 39–46.
9. Genta, F.A., Blanes, L., Cristofolletti, P.T., do Lago, C.L., Terra, W.R., and Ferreira, C. (2006) Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **36**, 789–800.
10. Jasarapura, S., Arakane, Y., Osman, G., Kramer, K.J., Beeman, R.W., and Muthukrishnan, S. (2010) Genes encoding proteins with peritrophin A-type chitin-binding domains in *Tribolium castaneum* are grouped into three distinct families based on phylogeny, expression and function, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **40**, 214–227.
11. Paek, A., Park, H.Y., and Jeong, S.E. (2012) Molecular cloning and functional expression of chitinase-encoding cDNA from the cabbage moth, *Mamestra brassicae*, *Mol. Cells*, **33**, 439–447.
12. Wu, Q., Liu, T., and Yang, Q. (2013) Cloning, expression and biocharacterization of OfCht5, the chitinase from the insect *Ostrinia furnacalis*, *Insect Sci.*, **20**, 147–157.
13. Zhu, Q., Arakane, Y., Banerjee, D., Beeman, R.W., Kramer, K.J., and Muthukrishnan, S. (2008) Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 452–466.
14. Gopalakrishnan, B., Muthukrishnan, S., and Kramer, K.J. (1995) Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene: Properties of the recombinant protein, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25**, 255–265.
15. Hao, C.J., Chai, B.F., Wang, W., Sun, Y., and Liang, A.H. (2005) Polyclonal antibody against *Manduca sexta* chitinase and detection of chitinase expressed in transgenic cotton, *Biotechnol. Lett.*, **27**, 97–102.
16. Assenga, S.P., You, M., Shy, C.H., Yamagishi, J., Sakaguchi, T., Zhou, J.L., Kibe, M.K., Xuan, X.N., and Fujisaki, K. (2006) The use of a recombinant baculovirus expressing a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* and its potential application as a bioacaricide for tick control, *Parasitol. Res.*, **98**, 111–118.
17. McCafferty, H.R., Moore, P.H., and Zhu, Y.J. (2006) Improved *Carica papaya* tolerance to carmine spider mite by the expression of *Manduca sexta* chitinase transgene, *Transgenic Res.*, **15**, 337–347.
18. Fan, X.J., Cao, J.B., Xu, C.G., Fu, Y.J., Zhang, Z.Y., and Liang, A.H. (2007) Study on virulence to larvae and mammiferous security of recombinant Baculovirus (AcMNPV-BmKIT-Chi), *Acta Agric. Boreali-Sin.*, **22**, 161–164.
19. Rao, R., Fiandra, L., Giordana, B., de Eguileor, M., Congiu, T., Burlini, N., Arciello, S., Corrado, G., and Pennacchio, F. (2004) AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **34**, 1205–1213.
20. Hodgson, J.J., Arif, B.M., and Krell, P.J. (2007) Reprogramming the chiA expression profile of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, *J. Gen. Virol.*, **88**, 2479–2487.

21. Lu, Y.M., Zen, K.C., Muthukrishnan, S., and Kramer, K.J. (2002) Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 1369–1382.
22. Kiefer, F., Arnold, K., Kunzli, M., Bordoli, L., and Schwede, T. (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 387–392.
23. Arakane, Y., and Muthukrishnan, S. (2010) Insect chitinase and chitinase-like proteins, *Cell Mol. Life Sci.*, **67**, 201–216.
24. Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., and Vorgias, C.E. (1994) Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution, *Structure*, **2**, 1169–1180.
25. Terwisscha, V.S., Hennig, M., and Dijkstra, B.W. (1996) The 1.8 Å resolution structure of hevimine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18, *J. Mol. Biol.*, **262**, 243–257.
26. Varela, P.F., Llera, A.S., Mariuzza, R.A., and Tormo, J. (2002) Crystal structure of imaginal disc growth factor-2. A member of a new family of growth-promoting glycoproteins from *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 13229–13236.
27. Tsai, M.L., Liaw, S.H., and Chang, N.C. (2004) The crystal structure of Ym1 at 1.31 Å resolution, *J. Struct. Biol.*, **148**, 290–296.
28. Chen, L., Liu, T., Zhou, Y., Chen, Q., Shen, X., and Yang, Q. (2014) Structural characteristics of an insect group I chitinase, an enzyme indispensable to moulting, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **70**, 932–942.
29. Xu, C.G., Fan, X.J., Fu, Y.J., and Liang, A.H. (2008) Effect of location of the His-tag on the production of soluble and functional *Buthus martensii* Karsch insect toxin, *Protein Express. Purif.*, **59**, 103–109.

**CLONING AND FUNCTIONAL EXPRESSION
OF A CHITINASE cDNA FROM THE APPLE LEAF
MINER MOTH *Lithocolletisringoniella***

**Xiao-Jun Fan*, Yan-Xia Mi, Hui Ren, Chang Zhang,
Yao Li, Xiao-Xiao Xian**

*Taiyuan University of Technology, College of Chemical
and Chemistry Engineering, Department of Biological and Pharmaceutical
Engineering, Taiyuan 030024, Shanxi, China; fax: +86(351)601-8534,
E-mail: fxjbio@163.com*

Received July 21, 2014

Revision received September 19, 2014

Insect chitinase plays essential roles in chitin catabolism involved in digestion and molting during insect development. In this work, we cloned a chitinase cDNA, *LrCht5*, from the apple leaf miner *Lithocolletisringoniella* and characterized its amino acid sequence and protein properties. The *L. ringoniella* chitinase cDNA was 2,136 bp in length with an open reading frame of 1,737 bp encoding a polypeptide of 579 amino acid residues with predicted molecular mass of 64.4 kDa and a *pI* of 5.49. The catalytic domain has several phosphorylation and glycosylation sites. The recombinant *LrCht5* was expressed in *Escherichia coli*, and the *Spodoptera frugiperda* cell line Sf9 and the *LrCht5* expressed in insect cells exhibited chitinolytic activity. *LrCht5* was most stable at pH 6.0 and 45°C. The current work has potential application in the development of novel and more specific synthetic chitinase inhibitors for use as bioinsecticides.

Key words: *Lithocolletisringoniella*, chitinase, RACE-PCR, enzyme activity