

УДК 577.152.34.02

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И СВОЙСТВА БЕЛКА-ИНГИБИТОРА ХИМОТРИПСИНА ИЗ КАРТОФЕЛЯ

© 2013 г. И. А. Парфёнов, Т. А. Ревина, Н. Г. Герасимова, Г. В. Кладницкая, Т. А. Валужева

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 16.05.2012 г.

Ген *PKPIJ-B*, кодирующий в картофеле (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова) белок-ингибитор химотрипсина, принадлежащий к подсемейству картофельных ингибиторов Кунитца (PKPI, potato Kunitz-type proteinase inhibitors) был клонирован в вектор pET23a и затем экспрессирован в клетки *Escherichia coli*. Рекомбинантный белок PKPIJ-B, полученный в виде телец включения, денатурировали, отделяли от примесей методом высоко эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на Mono Q в денатурирующих условиях и ренатурировали. Ренатурированный белок был дополнительно очищен с помощью ВЭЖХ на ДЭАЭ-Тоурераг. Белок PKPIJ-B эффективно подавлял активность химотрипсина, слабее действовал на трипсин и угнетал рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов, поражающих растения картофеля.

DOI: 10.7868/S0555109913010145

Ингибиторы протеиназ типа Кунитца из картофеля (PKPI – potato Kunitz-type proteinase inhibitors) представляют собой белки с молекулярными массами 20–25 кДа [1, 2]. На основании структуры N- и C-концевых аминокислотных последовательностей среди этих белков выделяют три структурные группы: А, В и С [1]. Установлено, что в геноме культурного картофеля имеются гены, кодирующие все три группы. При этом, вероятно, каждая группа кодируется множественными генами [2].

Ранее нами был выделен ген, обозначенный как *PKPIJ-B*, кодирующий в картофеле (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова) белок, принадлежащий к группе В [3]. Анализ аминокислотной последовательности, восстановленной по нуклеотидной последовательности этого гена, позволил определить, что он кодирует белок PKCI, выделенный нами ранее из клубней картофеля того же сорта и действующий как ингибитор химотрипсина и трипсина [4].

Нуклеотидная последовательность гена *PKPIJ-B* характеризовалась высокой степенью сходства (от 89 до 99% идентичных н.п.) с генами *PKPI-B9* (AY693424), *PKPI-B10* (AF536175.1) [5], *PI-2* (AY166690) [6], *KPi B-k2* (DQ168333.1) [7], *PIH5* (AF492359), *PAD11* (AF4955584), *SIC1* (AF492769) [2] и *gCDI-B1* (Q41484) [1], которые были обнаружены в картофеле сортов Истринский, Elkana, Kuras, Provita, Saturna и Danshaku соответственно. При этом наиболее вариабельные фрагменты последовательностей были расположены в 5'-концевой части молекул. Анализируя положения замен

нуклеотидов в этих последовательностях, можно сделать заключение, что они локализируются в одних и тех же участках. Весьма вероятно, что в этих участках и происходили рекомбинации. Оказалось, что восстановленная по последовательности нуклеотидов аминокислотная последовательность белка, кодируемого геном *PKPIJ-B*, содержит уникальные замены [3, 4].

Замены остатков в аминокислотных последовательностях ингибиторов PKPI могут приводить к изменению специфичности их действия на протеиназы. Например, три белка группы В, полученные в результате экспрессии в *Schizosaccharomyces pombe*, идентичность в аминокислотных последовательностях которых составляла только 97%, проявляли различную специфичность действия по отношению к сериновым протеиназам, трипсину, α -химотрипсину и субтилизину, а также к цистеиновой протеиназе, папаину [8]. Вариабельность структуры и свойств белков PKPI, возможно, имеет важное функциональное значение и играет определенную роль в защитном ответе растений при атаке патогенными организмами [9–11]. В наших работах [12, 13] было показано, что в клубнях картофеля, инфицированных оомицетом *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, а также подверженных механическому повреждению, накапливаются ингибиторы протеиназ, основную долю которых составляют белки PKPI-B. Эти белки обладают высокой токсичностью по отношению к патогену, подавляя прорастание гиф и ускоряя разрушение зооспор оомицета [12, 13].

Цель работы – получение высокоочищенного рекомбинантного белка РКРІІ-В и изучение его свойств.

МЕТОДИКА

Тотальную РНК выделяли из 2 нед проростков картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова) по методу, описанному в работе [14]. Методом обратной транскрипции, используя выделенную мРНК как матрицу, была получена кДНК картофеля. Для выделения геномной ДНК использовали штамм *Escherichia coli* BL-21(DE3), вектор pUC18 [15] и pGEM-T-Easy фирмы “Promega” (США).

Прямой 5-atggatccaacctactagtgctactccagta-3 и обратный 5-attggatcctactggacttgggtgaaggagacatcaaggatt-3 олигонуклеотидные праймеры, гомологичные областям генов группы В, кодирующим N- и C-концевые участки зрелых белков и не содержащие вырожденных позиций, были сконструированы с использованием программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Vector NTI (<http://www.invitrogen.com>) и описаны в работе [3]. Использовали также штамм *E. coli* BL21(DE3) и вектор pET23a (“Promega”) для проведения гетерологичной экспрессии, рестриктазы *NdeI*, *SacI* и *XhoI* (“МБИ Ферментас”, Литва), хромогенные субстраты (*n*-нитроанилиды N-сукцинил-L-глицил-L-глицил-L-фенилаланина (СукГГФПА), N- α -бензоил-L-аргинина (БАПА), N-карбобензоксиг-Л-аланил-L-аланил-L-лейцина (КбзААЛПА) и L-пироглутамил-L-фенилаланил-L-лейцина (ПрФЛПА) фирмы “Calbiochem” (США), химотрипсин (КФ 3.4.21.1.) (“Serva”, Германия), трипсин (КФ 3.4.21.4) (“Spofa”, Чехия), дополнительно перекристаллизованный из сульфата магния, субтилизин Карлсберг (КФ 3.4.21.14) (“Sigma”, США), папаин (КФ 3.4.22.1) (“Fluka”, Швейцария), а также низкомолекулярные белки-маркеры фирмы “Pharmacia” (Швеция).

Процедуры выделения геномной ДНК картофеля, амплификацию, молекулярное клонирование, выделение плазмидной ДНК и рестрикционный анализ проводили согласно методам, описанным ранее [4].

Секвенирование плазмидных конструкций осуществляли на автоматическом секвенаторе AbiPrism 310 (“Applied Biosystems”, США) с использованием стандартных праймеров pUC/M13, T7-promoter и SP6 (“Promega”).

Продукт, полученный в результате амплификации геномной ДНК картофеля с использованием прямого и обратного праймеров, был клонирован в вектор pET-23, линеаризованный по сайту *Eco32.I*. Была отобрана рекомбинантная плаزمида pUK-18, содержащая фрагмент ДНК размером 587 п.н., включающая часть кодирую-

щей области гена *PKPII-B*, которая соответствует зрелому белку РКРІІ-В, содержащему в N-концевой части дополнительно семь аминокислотных остатков, входящих в состав пептида вакуолярного сортирования [1]. Плазмиду pUK-18 обрабатывали рестриктазами *NdeI* и *SacI*, сайты узнавания которых содержались, соответственно, в полилинкере вектора pUK18 и в прямом праймере. Полученный в результате фрагмент плазмиды был клонирован в экспрессионный вектор pET23a, расщепленный рестриктазами *NdeI* и *XhoI*. Итоговая плазмиды была обозначена pKT-B1.

Трансформацию *E. coli* BL21(DE3) экспрессионной плазмидой pKT-B1 осуществляли в соответствии со стандартным методом [16]. Бактерии, несущие плазмиду pKT-B1, культивировали в чашках на агаризованной среде LB (10 г/л пептон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl), содержащей ампициллин в концентрации 100 мг/л и глюкозу в концентрации 0.4%. Полученные колонии бактерий, имеющие возраст не более 30 ч с момента трансформации, смывали 6 мл свежей среды LB и использовали полученный смыв для засева 2 колб, содержащих по 100 мл жидкой среды LB (10 г/л пептон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 20 г/л NaCl), содержащей ампициллин в концентрации 100 мг/л. Ферментация осуществлялась в условиях интенсивной аэрации при 30°C в течение еще 24 ч в отсутствие индуктора изопропилтиогалактозида. По окончании ферментации выращенную биомассу собирали центрифугированием и промывали физиологическим раствором для удаления остатков среды. Клетки ресуспензировали в 0.05 М трис-НСІ-буфере, рН 8.0, охлаждали до 0°C и дезинтегрировали с помощью ультразвука на Soniprep-150 (“MSE-Sanyo”, Великобритания–Япония). Полученную суспензию центрифугировали при 1500 g в течение 30 мин для отделения нерастворимой клеточной фракции, содержащей тельца включения. Собранную фракцию телец включения ресуспензировали в деионизованной воде и вторично осаждали в тех же условиях. Процедуру повторяли 2–5 раз.

Солюбилизацию белка осуществляли с помощью денатурирующего буфера (0.05 М трис-НСІ-буфер, рН 8.0, содержащем 7 М мочевины и 0.01 М ДТЭ) при 65°C в течение 1 ч. Затем раствор центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин. Осветленный супернатант (5 мл) наносили на колонку (2.5 × 30 см) с Mono Q (“Pharmacia”, Швеция), уравновешенным 0.05 М трис-НСІ-буфером, рН 8.0, содержащим 7 М мочевины. Количество целевого белка в препарате составляло от 10 до 50 мг. Связанный с сорбентом материал элюировали линейным градиентом повышающейся концентрации NaCl от 0 до 1 М в стартовом буфере. Фракции, содержащие целевой белок (1–2 мг/мл), объединяли.

Ренатурацию денатурированного белка проводили путем диализа против 0.05 М трис-НСl-буфера, рН 8.0, при 4°C в течение 96 ч с однократной сменой буфера. Затем полученную суспензию центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин. Супернатант, содержащий ренатурированный белок РКРІІ-В, наносили на колонку (2.5 × 30 см) с ДЭАЭ-ToyoPearl (“Toyo Soda”, Япония), уравновешенным 0.05 М трис-НСl-буфером, рН 8.0. Связавшийся с ионообменником белок элюировали линейным градиентом повышающейся концентрации NaCl от 0 до 1 М в стартовом буфере. Фракции, содержащие белок РКРІІ-В, объединяли, обессоливали и концентрировали ультрафильтрацией на ячейке Амикон (США) с мембраной UM-2, а затем лиофильно высушивали.

Диск-электрофорез в 20%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na и β-меркаптоэтанола (ДДС-ПААГ) проводили по Лэммли [17]. Гели окрашивали 0.1%-ным раствором кумасси R-250 в 25%-ном растворе этанола, содержащем 5% формальдегида.

Активность рекомбинантного белка РКРІІ-В оценивали по степени подавления активности соответствующих ферментов (трипсин, химотрипсин, субтилизин Карлсберг и папаин). Активность ферментов определяли по скорости гидролиза хромогенных субстратов: БАПА (для трипсина), СукГГФПА (для химотрипсина), КбзААЛПА (для субтилизина) и ПгФЛПА (для папаина) [18–21]. Концентрацию активных ферментов определяли титрованием активных центров: трипсина – *n*-нитрофенил-*n*'-гуанидинобензоатом [22] и химотрипсина – *N*-транс-циннамоилимидазолом [23].

Молекулярную массу комплексов ингибитора с ферментами определяли высоко эффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на колонке Bio Sep-S-200 (“Beckman Coulter”, США). Гель уравновешивали 0.02 М фосфатным буфером, рН 7.0, содержащим 0.1 М NaCl. Белки элюировали стартовым буфером.

Влияние белка на рост и развитие макроконидий гриба *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. и зооспор оомицета *P. infestans* изучали с помощью метода, описанного в работе [24]. Суспензию макроконидий гриба или зооспор оомицета (2000000 спор в 1 мл) получали, смывая их с поверхности 14-суточного мицелия, выросшего при 25°C на овсяно-агаровой среде с добавлением термостабильных белков картофеля. Количество проросших и лизированных макроконидий (зооспор) и длину гиф, образующихся при их прорастании, определяли в трехкратной повторности для каждой концентрации белка на микроскопе Laboval (Германия) при увеличении 120×. В качестве контроля использовали суспензию макроконидий (зооспор) без добавления РКРІІ-В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате предварительного анализа клонов геномной ДНК картофеля была отобрана рекомбинантная плазмида рUK18, в составе которой присутствовал фрагмент ДНК размером 587 п.н. Этот фрагмент включал часть кодирующей области гена *PKPII-B*, которая соответствовала зрелому белку РКРІІ-В, содержащему в качестве *N*-концевой последовательности дополнительные остатки Met-Асп-Про-Иле-Гли-Лей-Асп-. Эта последовательность входит в состав консервативного пептида белка-предшественника, кодирующего вакуоль-распределяющий сигнал [1]. Плазмида рUK18 была использована для создания экспрессионной плазмиды рКТ-В1, кодирующей белок, содержащий в *N*-концевой части дополнительно девять аминокислотных остатков (рис. 1).

Ожидаемый продукт экспрессии рКТ-В1, представляющий собой рекомбинантный белок РКРІІ-В, был обнаружен в основном в тельцах включения и в меньшем количестве в растворимой фракции клеточных белков *E. coli* штамма BL21(DE3). Молекулярная масса полученного белка РКРІІ-В, определенная методом ДДС-ПААГ-электрофореза, имела значение около 25 кДа и совпадала с расчетной величиной, составлявшей 24.7 кДа [4]. В клетках контрольных бактерий, трансформированных вектором рЕТ23b, не содержащим вставки, белковый продукт с такой молекулярной массой не обнаруживался.

Нерастворимая фракция, содержащая тельца включения *E. coli*, была солибилизирована в денатурирующем буфере. Известно, что в процессе ренатурации белков *in vitro* может происходить как правильный, так и ошибочный фолдинг белковых молекул, а также их агрегация вследствие межмолекулярных взаимодействий [25]. Хотя в литературе имеются указания на то, что наличие посторонних примесей практически не влияет на фолдинг целевого белка [25], предварительные эксперименты показали, что присутствие небелковых примесей отрицательно сказывается на процессе ренатурации белка РКРІІ-В. В связи с этим денатурированные тельца включения были подвергнуты очистке от белковых и небелковых примесей. На рис. 2 приведены результаты выделения целевого белка методом ВЭЖХ на колонке с Mono Q при рН 8.0 в присутствии 7 М мочевины. По данным ДДС-ПААГ-электрофореза, компонент I содержал в основном белок РКРІІ-В и был практически отделен от примесей, присутствовавших в клеточном лизате *E. coli*. Выход денатурированного целевого белка РКРІІ-В составил 2 мг на 0.4 г биомассы.

Известно, что рефолдинг солибилизированных белков телец включения *E. coli* осуществляется либо путем быстрого разбавления раствора,

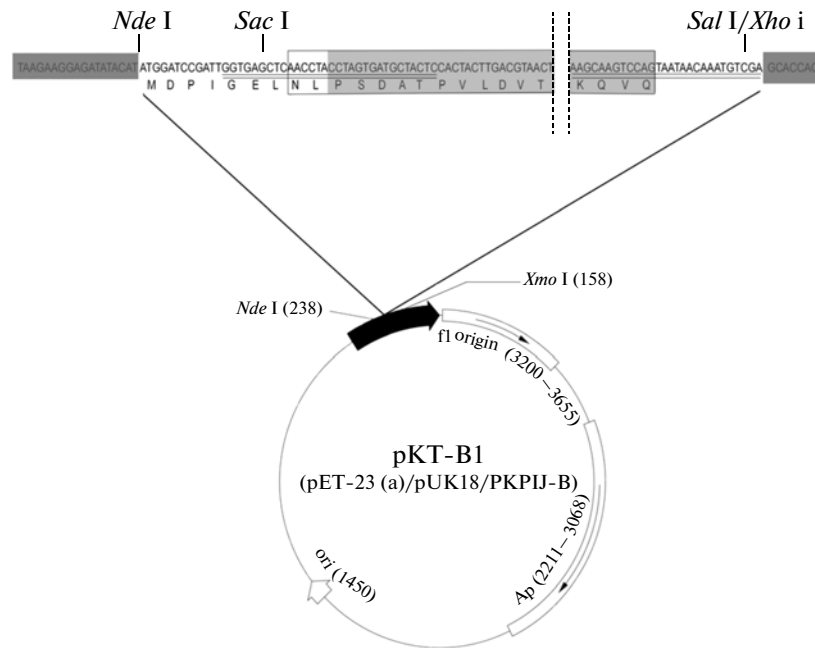


Рис. 1. Схема создания рекомбинантной плазмиды pKT-B1. Последовательность нуклеотидов вектора pET23a заштрихована темно-серым цветом, N- и С-концевые участки зрелого белка, кодируемого геном PKPIJ-B, — светло-серым; фрагмент прямого и обратного праймеров подчеркнут двойной линией, в рамку заключены N- и С-концевые области гена PKPIJ-B. Стрелками указаны сайты действия рестриктаз NdeI, SacI и SalI.

либо путем диализа, который обеспечивает плавное снижение концентрации денатурирующего агента. Правильный фолдинг белка при отсутствии межмолекулярной агрегации может происходить как в тех, так и в других условиях и зависит от свойств белка [25]. Это определяется только экспериментальным путем. В предварительных экспериментах было установлено, что фолдинг РКPIJ-B проходит с высокой эффективностью, как при быстром разбавлении денатурирующего раствора, так и при диализе. Основная масса бел-

ка РКPIJ-B была ренатурирована путем диализа против 0.05 М трис-НСl-буфера, рН 8.0.

Ренатурированный РКPIJ-B дополнительно очищали до гомогенности методом анионообменной FPLC-хроматографии на ДЭАЭ-ТоуоРearl при рН 8.0 (рис. 3). По данным ДДС-ПААГ-электрофореза компонент I-1, элюирующийся при концентрации NaCl 0.15 М, содержал гомогенный белок РКPIJ-B (рис. 4). На основании данных электрофореза можно также заключить,

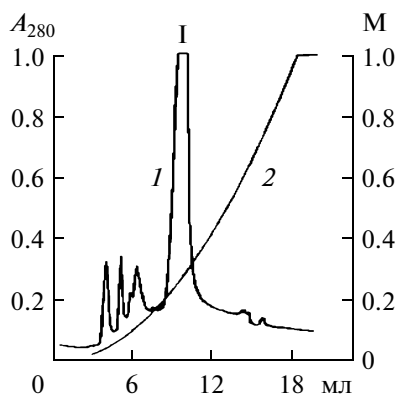


Рис. 2. ВЭЖХ на колонке с Mono Q белков, образующихся при денатурации телец включения: I — компонент, содержащий денатурированный рекомбинантный белок РКPIJ-B; 1 — A_{280} , 2 — NaCl, М.

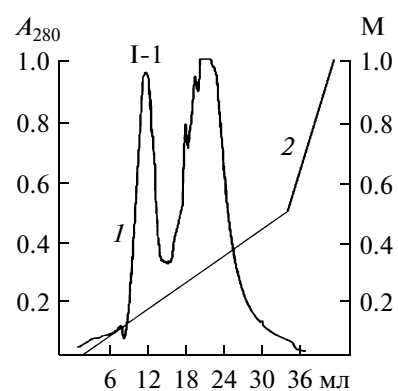


Рис. 3. ВЭЖХ компонента I на колонке с ДЭАЭ-ТоуоРearl.

I-1 — компонент, содержащий рекомбинантный белок РКPIJ-B; 1 — A_{280} , 2 — NaCl, М.

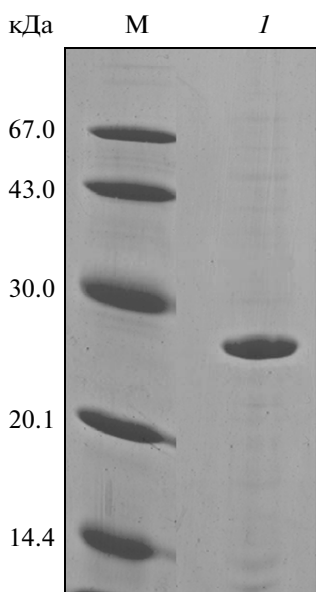


Рис. 4. ДДС-ПААГ-электрофорез компонента I-1, полученного после ВЭЖХ на колонке с ДЭАЭ-Toyo-pearl.

I – белок РКРІІ-В, М – белки-маркеры (сверху вниз): БСА, яичный альбумин, карбоангидраза, соевый ингибитор трипсина Кунитца, лактальбумин; значения молекулярных масс белков-маркеров, кДа.

что молекула рекомбинантного белка РКРІІ-В состоит из одной полипептидной цепи.

Результаты изучения влияния белка РКРІІ-В на активность трипсина и α -химотрипсина приведены на рис. 5. Видно, что белок эффективно подавлял активность химотрипсина и в несколько меньшей степени трипсина. Зависимость степени подавления активности химотрипсина от количества добавленного ингибитора сохраняла линейный характер до достижения 80%-ного ингибирования (рис. 5, кривая 1), а трипсина – 78%-го (рис. 5, кривая 2). Расчеты показали, что 1 моль РКРІІ-В реагировал стехиометрически с 1 молекул, как химотрипсина, так и трипсина. В то же время белок РКРІІ-В очень слабо действовал на активность субтилизина Карлсберг и не подавлял активность цистеиновой протеиназы, папаина.

При ВЭЖХ на колонке Bio Sep-Sec-S-200 смесей, содержащих эквимольные количества рекомбинантного белка РКРІІ-В, α -химотрипсина и трипсина, элюировался только один тяжелый компонент с молекулярной массой 65 ± 1 кДа, представляющий собой, вероятнее всего, тройной комплекс ингибитора с ферментами, в котором с одной молекулой ингибитора связывались одновременно одна молекула α -химотрипсина и одна молекула трипсина. Это свидетельствует о том, что рекомбинантный белок является “двуглавым” ингибитором и содержит два независимо

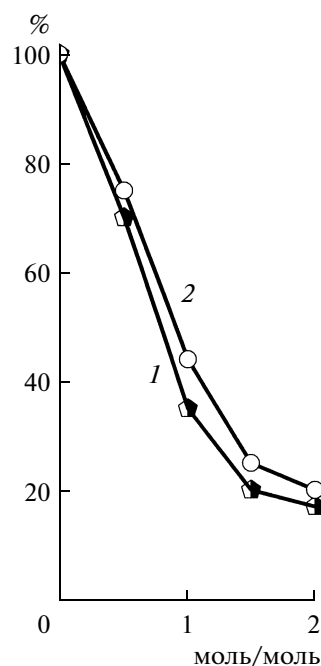


Рис. 5. Влияние рекомбинантного белка РКРІІ-В на активность химотрипсина (1) и трипсина (2).

Измеряли остаточную активность ферментов (% от исходной) при различных соотношениях ингибитор/фермент. В качестве субстратов использовали СукГГФПА (1) и БАПА (2).

действующих реактивных центра, ответственных за связывание каждой из этих протеиназ.

Таким образом, рекомбинантный белок РКРІІ-В и выделенный нами из клубней картофеля белок РКСІ [4] обладают одинаковым характером действия на протеиназы. Некоторое снижение активности белка РКРІІ-В по отношению к протеиназам может быть обусловлено наличием в N-концевой части его молекулы дополнительных аминокислотных остатков, которые были добавлены при конструировании экспрессионной плазмиды.

В предыдущей работе [3] было показано, что белок РКСІ, выделенный из клубней картофеля сорта Юбилей Жукова, угнетает рост и развитие двух фитопатогенных микроорганизмов: гриба *F. culmorum* и оомицета *P. infestans*, поражающих растения картофеля. Оказалось, что белок РКСІ слабее действовал на рост и развитие оомицета, чем гриба. В связи с этим представлялось интересным исследовать действие рекомбинантного белка РКРІІ-В на рост гиф и развитие макроконидии гриба *F. culmorum* и зооспор оомицета *P. infestans*. На рис. 6 представлены результаты этого исследования. Оказалось, что при добавлении 400 мкг белка РКРІІ-В длина растущих гиф гриба уменьшалась на 40% по сравнению с контролем (рис. 6а, кривая 1). При этом более чем 50% макроконидий подвергались повреждению (рис. 6а,

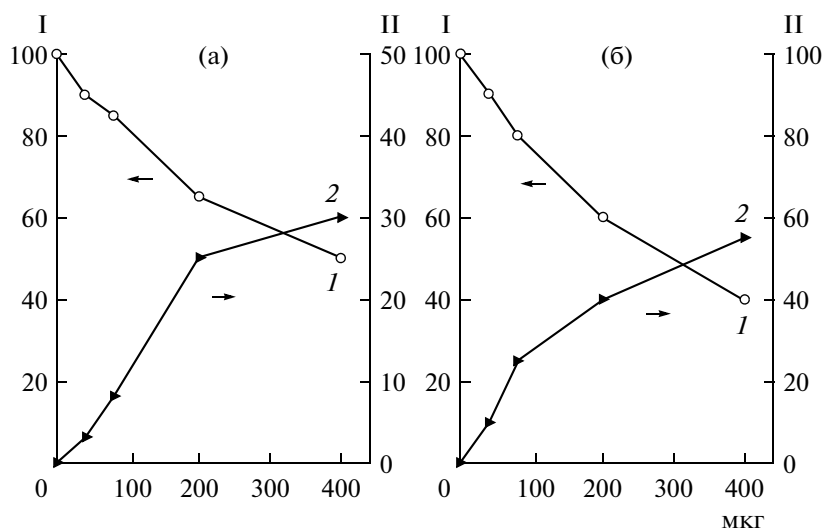


Рис. 6. Влияние рекомбинантного белка РКPIJ-B (мкг) на прорастание гиф и лизис макроконидий гриба *F. culmorum* (а) и зооспор оомицета *P. infestans* (б) 1 – размер гиф (шкала I, % от контроля), 2 – количество лизированных макроконидий или зооспор (шкала II, % от контроля). Представлены средние значения трех независимых экспериментов со стандартной ошибкой от 2 до 10%.

кривая 2). При той же концентрации белка РКPIJ-B длина гиф оомицета уменьшалась только на 20% (рис. 6б, кривая 1) и разрушению подвергались всего 30% его зооспор (рис. 6б, кривая 2). Таким образом, белок РКPIJ-B так же, как белок РКCI, присутствовавший в клубнях картофеля Юбилей Жукова [3], слабее действовал на рост и развитие оомицета, чем гриба.

Полученные результаты указывают на то, что методом гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli*, трансформированных плазмидой рКТ-В1, синтезировался белок РКPIJ-B с молекулярной массой около 25 кДа, молекула которого состоит из одной полипептидной цепи. Рекомбинантный белок РКPIJ-B действовал как эффективный ингибитор химотрипсина и трипсина, был способен образовывать тройные комплексы, в которых с одной молекулой ингибитора одновременно связывались два различных фермента, а также подавлял рост и развитие двух фитопатогенных микроорганизмов, поражающих растение картофеля. Это с большой степенью вероятности свидетельствует о том, что рекомбинантный белок РКPIJ-B идентичен белку РКCI, обнаруженному нами в клубнях картофеля сорта Юбилей Жукова [3, 4].

Следует отметить, что отсутствие или присутствие определенных аминокислотных остатков в первичной структуре определяет специфичность действия ингибиторов РКCI. В нашей предыдущей работе [4] была отмечена высокая изменчивость в последовательностях белков РКCI-В на участке, расположенном между остатками Цис147 и Цис164, которая согласуется с данными об их высокой функциональной значимости для молекулы ингибитора [7]. Мы предположили, что обра-

зование замен, расположенных на этом участке, происходит в результате независимых мутаций. Вполне вероятно, что полиморфизм генов *PKPIJ-B* является следствием адаптивной эволюции, направленной на защиту растений от фитопатогенных микроорганизмов и насекомых-вредителей. Большой набор вариантов генов белков-ингибиторов способен привести к экспрессии их новых изоформ, которые позволят противостоять адаптации фитопатогенов к ингибиторам. Можно предположить, что при активации гена *PKPIJ-B* в клубнях картофеля экспрессируется белок РКCI, обладающий токсичностью по отношению к фитопатогенам, который включается в защитную систему растения картофеля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K. // Plant Cell Physiol. 1994. V. 35. № 2. P. 303–312.
2. Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C. // Mol. Gen. Genomics. 2003. V. 269. № 4. P. 526–534.
3. Ревина Т.А., Парфёнов И.А., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 265–271.
4. Valueva T.A., Parfenov I.A., Revina T.A., Morozkina E.V., Benevolensky S.V. // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 52. № 1. P. 83–90.
5. Сперанская А.С., Крилицына А.А., Полтроньеры П., Фазано Л., Сантино А., Шевелев А.Б., Валуева Т.А. // Биохимия. 2005. Т. 70. № 3. С. 360–369.
6. Pouvreau L., Gruppen H., van Koningsveld G.A., van den Broek L.A.M., Voragen A.G.J. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 17. P. 5001–5005.

7. Bauw G., Nielsen H.V., Emmersen J., Nielsen K.L., Jorgensen M., Welinder K.G. // FEBS J. 2006. V. 273. № 15. P. 3569–3584.
8. Heibges A., Salamini F., Gebhardt C. // Mol. Gen. Genom. 2003. V. 269. № 4. P. 535–541.
9. Jongsma M.A., Bolter C. // J. Insect. Physiol. V. 43. № 3. P. 885–895.
10. Валеева Т.А., Мосолов В.В. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1600–1606.
11. Cristeller J.T. // FEBS J. 2005. V. 272. № 22. P. 5710–5722.
12. Valueva T.A., Revina T.A., Kladnitskaya G.V., Mosolov V.V. // FEBS Lett. 1998. V. 426. № 1. P. 131–134.
13. Валеева Т.А., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л. // Биооргани. химия. 2003. Т. 29. № 5. С. 499–504.
14. Krapp A., Hoffman B., Schafer C., Stitt M. // Plant J. 1993. V. 3. № 6. P. 817–828.
15. Vieira J., Messin J. // Gene. 1991. V. 100. № 1. P. 184–194.
16. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982. V. 3. P. 507–520.
17. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
18. Kakade M.L., Simons N., Liener I.E. // Cereal Chem. 1969. V. 46. № 5. P. 518–526.
19. Bieth J., Wermuth C.G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. V. 53. № 2. P. 383–390.
20. Люблинская Л.А., Якушева Л.Д., Степанов В.М. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 273–279.
21. Filippova I.Ju., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 203–297.
22. Shonbaum G.R., Lerner B., Bender M.Z. // Biol. Chem. 1961. V. 236. № 11. P. 2930–2935.
23. Chase T., Shaw E. // Meth. Enzymol. 1970. V. 19. P. 20–27.
24. Ревина Т.А., Герасимова Н.Г., Кладницкая Г.В., Чаленко Г.И., Валеева Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 1. С. 101–105.
25. Rudolph R., Lilie H. // FASEB J. 1996. V. 10. № 1. P. 49–56.

Heterologous Expression, Purification, and Properties of a Chymotrypsin Inhibitor Isolated from Potatoes

I. A. Parfenov, T. A. Revina, N. G. Gerasimova, G. V. Kladnitskaya, and T. A. Valueva

Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Received May 16, 2012

Abstract—The *PKPIJ-B* gene encoding a chymotrypsin inhibitor from a subfamily of potato Kunitz-type proteinase inhibitors (PKPI) in potatoes (*Solanum tuberosum* L. cv. Yubilei Zhukova) was cloned into a pET23a vector and then expressed in *Escherichia coli*. The recombinant PKPIJ-B protein obtained in the inclusion bodies was denatured, purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) on Mono Q under denaturing conditions, and renatured. The renatured protein was additionally purified using HPLC on DEAE-ToyoPearl. The PKPIJ-B protein efficiently suppressed chymotrypsin activity, had a weaker effect on trypsin, and inhibited the growth and development of phytopathogenic microorganisms affecting potato plants.