

Получение и свойства белка INF1 фитофторы

Научный руководитель – Чичкова Нина Валентиновна

Литвинова Анастасия Васильевна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: nas-lit@bk.ru

INF1 – белок, секретируемый фитофторой *Phytophthora infestans* при заражении растения и относящийся к классу элиситинов. Он способен вызывать гиперчувствительный ответ (ГО) в тканях растений [1], что является одним из видов программированной клеточной смерти (ПКС) у растений. Важную роль в осуществлении ГО играют фитаспазы – протеолитические ферменты, являющиеся функциональными аналогами каспаз животных [2]. При развитии защитной реакции в ответ на инфекцию протеолитически активная фитаспаза, в норме локализованная вне клетки (в апопласте), транспортируется внутрь растительных клеток [2], однако процессы, лежащие в основе ретроградного транспорта, и дальнейшее действие фермента в клетке всё ещё неясны. Таким образом, INF1 – это перспективный инструмент для моделирования ПКС у растений под воздействием биотического фактора для исследования молекулярных взаимодействий фитаспазы.

Ген *inf1* был амплифицирован из генома *P. infestans* и клонирован в плазмиду pET28-a с целью наработки белка в клетках *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3). Полученная конструкция кодирует рекомбинантный INF1 (без сигнального пептида) с гексагистидиновым тэгом на N-конце белка для выделения с помощью аффинной хроматографии. Были подобраны оптимальные условия выращивания бактериальной культуры, при которых нарабатывается наибольшее количество белка INF1. Также проводили подбор условий для выделения белка из лизата клеток *E. coli*. Было обнаружено, что в нативных условиях целевой белок выделяется в незначительных количествах, несмотря на то, что INF1 является секреторным. Были найдены условия (присутствие 8 М мочевины), способствующие эффективному выделению рекомбинантного белка. Затем осуществляли ренатурацию белка, связанного с Ni-NTA агарозой, и его элюцию.

Полученный препарат INF1 был охарактеризован с помощью гель-электрофореза и имел концентрацию белка 1-2 мкг/мкл. Он был исследован на наличие биологической активности путем инфильтрации в листья растений. Раствор белка в концентрации 100 нМ вызывал гиперчувствительный ответ в листьях табака *Nicotiana tabacum* и бентамианы *N. benthamiana*, области некроза проявлялись через 24 часа после инфильтрации. Полученный рекомбинантный белок будет исследован на способность индуцировать ретроградный транспорт фитаспазы.

Источники и литература

- 1) Kamoun S, van West P, de Jong AJ, de Groot KE, Vleeshouwers VG, Govers F. A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Mol Plant Microbe Interact.* 1997 Jan;10(1):13-20. doi: 10.1094/MPMI.1997.10.1.13
- 2) Chichkova NV, Shaw J, Galiullina RA, Drury GE, Tuzhikov AI, Kim SH, Kalkum M, Hong TB, Gorshkova EN, Torrance L, Vartapetian AB, Taliansky M. Phytaspase, a relocalisable cell death promoting plant protease with caspase specificity. *EMBO J.* 2010 ;29(6):1149-61. doi: 10.1038/emboj.2010.1