

УДК 632.754:633.11:577.151:577.27

## ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСА ПРОТЕИНАЗ КЛОПА ВРЕДНАЯ ЧЕРЕПАШКА *EURYGASTER INTEGRICEPS* PUT., ГИДРОЛИЗУЮЩИХ БЕЛКИ КЛЕЙКОВИНЫ ПШЕНИЦЫ

**А.В. Конарев<sup>1</sup>, В.В. Долгих<sup>1</sup>, И.В. Сендерский<sup>1</sup>, А.В. Конарев<sup>2</sup>, А.В. Капусткина<sup>1</sup>,  
Л.И. Нефедова<sup>1</sup>, Н.К. Губарева<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург

Протеиназы слюнных желез вредной черепашки и других хлебных клопов, способные гидролизовать основные белки клейковины пшеницы – глиадины и глютенины, ответственны за ухудшение качества муки из поврежденного насекомыми зерна пшеницы. Ограничение активности данных протеиназ может являться одним из путей к снижению причиняемого вредителями ущерба, что обуславливает необходимость их изучения. Методами изоэлектрического фокусирования, электрофореза и иммуноблоттинга в сочетании с методами субстратных реплик оценена сложность состава и выявлен ряд особенностей функционирования комплекса протеолитических ферментов, участвующих как во внекишечном, так и внутрикишечном пищеварении клопа вредная черепашка. С помощью иммунохимических методов показано присутствие протеиназы GHP3, способной гидролизовать запасные белки зерна пшеницы, в секреторных гранулах клеток слюнных желез вредителя в форме неактивного профермента. Обработка белков слюнных желез клопа иммобилизованным трипсином приводит к отщеплению пропептидов и появлению активных форм GHP3 и других протеиназ. Полученные данные позволяют предположить наличие в слюнных железах и кишечнике специфичных трипсиноподобных протеиназ, осуществляющих активацию проферментов при питании клопа зерном пшеницы. Обсуждаются возможности использования результатов исследования для решения задач защиты растений.

**Ключевые слова:** вредная черепашка, слюнная железа, поврежденное зерно, протеиназа, GHP3, клейковина, глютенин, субстратная реплика, антитела к рекомбинантной протеиназе.

Одними из главных факторов вредоносности хлебных клопов, принадлежащих к семействам Scutelleridae, Pentatomidae, Lygaeidae и другим, являются протеолитические ферменты их слюнных желез, осуществляющие внекишечное переваривание запасных белков эндосперма зерна пшеницы и других злаков [Вилкова, Буринская, 1977; Sivri and Koksel, 2000; Every et al., 2005; Павлюшин и др., 2015]. Разрушение белков и углеводов внекишечными гидролазами клопов оказывает негативное влияние на всхожесть и другие характеристики зерна [Капусткина и Нефедова, 2013]. Однако основной ущерб качеству урожая пшеницы наносят протеолитические ферменты, остающиеся в следовых количествах в поврежденном зерне и сохраняющие активность после его созревания и даже длительного хранения [Salis et al., 2010; Конарев и др. 2013; Olanca et al., 2016]. На протяжении нескольких десятилетий в России и ряде стран Европы и Азии ведутся исследования протеиназ вредной черепашки *Eurygaster integriceps* Put. (Scutelleridae) и других хлебных клопов. Несмотря на то что в последние годы удалось выделить и охарактери-

зовать отдельные протеиназы у разных видов клопов, а также клонировать и экспрессировать в клетках микроорганизмов ряд кодирующих их последовательностей ДНК [Konarev et al., 2011; Yandamuri et al., 2014; Долгих и др., 2014; Конарев и др., 2014], целостное представление о составе и свойствах данных ферментов пока отсутствует. Одним из сдерживающих факторов в изучении протеиназ являются особенности их субстратной специфичности, что накладывает отпечаток на подбор или создание адекватных методов анализа. Знание свойств протеиназ хлебных клопов (ПХК) необходимо для разработки подходов к снижению причиняемого ими ущерба, в том числе при создании устойчивых сортов пшеницы. Среди возможных и безопасных для человека и окружающей среды путей ограничения активности протеиназ вредителей выделяют использование их белковых ингибиторов [Мосолов и Валуева, 2008; Jamal et al., 2012; Shamsi et al., 2016].

Особенность протеиназ хлебных клопов – низкая чувствительность к известным белковым ингибиторам из растений [Konarev et al., 2011]. Среди путей к ограничению

нежелательной активности протеиназ, разрабатываемых в медицине, можно выделить конструирование специфических ингибиторов на основе известных молекулярных структур или создание антител к ферментам, способных блокировать их связывание с субстратами. Учитывая высокую специфичность антител, их безопасность для человека и животных, а также возможность встраивания кодирующих их последовательностей в геном растений, такой подход может быть использован и для решения задач защиты растений. Кроме того, антитела к протеиназам могут служить эффективным инструментом для изучения самих ферментов и представлять интерес в качестве критериев диагностики повреждения семян растений сосущими вредителями. Уже показана возможность использования поликлональных антител к белкам слюнных желез

для диагностики повреждения зерен пшеницы вредной и маврской черепашками [Гаврилюк и др. 1975; Vaccino et al., 2016] или семян сосны клопом *Leptoglossus corculus* Say (Coreidae) [Lait et al., 2003]. Следует отметить, что в данных работах не определялись природа и функции антигенов. Между тем, использование антител, специфичных к пищеварительным протеиназам насекомых, могло бы расширить возможности диагностики. Недостаточно изученными остаются также процессы синтеза и секреции протеиназ клопов при питании зерном.

Задачей работы было продолжить начатое ранее [Konarev et al., 2011, Долгих и др., 2014; Конарев и др., 2014] изучение состава и свойств протеиназ слюнных желез вредной черепашки с помощью иммунохимических и других методов анализа.

### Материал и методы

Зерно пшеницы, поврежденное вредной черепашкой и другими клопами рода *Eurygaster* Lap., получено из Саратовской области (образец мягкой пшеницы сорта Джангаль, 2009 г.) и других регионов России, а также Турции (образец твердой пшеницы сорта Ege-88, 2004). Неповрежденные зерна использовались в качестве контроля.

Слюнные железы и кишечники выделяли из имаго вредной черепашки [Konarev et al., 2011], полученных из различных регионов Поволжья и Северного Кавказа.

Белковые фракции, содержащие протеиназы, экстрагировали из размолотых поврежденных зерен 0.01% раствором Triton X-100 (1:5) в течение 20 мин. Для изофокусирования (ИЭФ) препараты концентрировали осаждением в 4-кратном объеме ацетона с последующим растворением осадка в 0.01% Triton X-100 в объеме, эквивалентном весу зерна.

Слюнные железы от 10 особей гомогенизировали с 50 мкл 1% CHAPS и центрифугировали. Надосадочную жидкость хранили при -20°C с 50% глицерином. Для обработки белков слюнных желез трипсином использовали фермент, иммобилизованный на полиакриламидном геле Trypsin Enzygel (Boehringer Mannheim). Инкубирование белковых экстрактов с трипсином вели в 0.02 М трис-HCl буфере pH 8.5. 1 мг сухого геля добавляли к 30 мкл экстракта с добавленным до концентрации 20 мМ трис-HCl буфером и инкубировали при 37°C от 0.5 до 16 часов.

Рекомбинантную протеиназу rGHP3e1 получали методом гетерологической экспрессии в бактериях [Долгих и др., 2014] препарата кДНК, кодирующего зрелый фермент изоформы 3 гидролизующей глютеинин протеиназы черепашки (GHP3; GenBank: NM579787.1) [Konarev et al., 2011]. Активные рекомбинантные формы rGHP3p1 и rGHP3p2 экспрессировали в клетках дрожжей *Pichia pastoris* [Долгих и др., 2014].

Поликлональные антитела получали иммунизацией кроликов препаратом рекомбинантной протеиназы rGHP3e1, как описано ранее [Долгих и др., 2014], а также иммунизацией мышей гомогенатами слюнных желез. Создание библиотеки рекомбинантных антител к протеиназе rGHP3e1, отбор рекомбинантных scFv-фрагментов антител к rGHP3e1 и наработка scFv-фрагментов путем гетерологической экспрессии в бактериях *E. coli* описаны в статье Долгих и др. [2017] в этом же выпуске журнала.

Для иммунофлюоресцентного анализа слюнных желез имаго клопов фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), инкубировали в 30% растворе сахарозы на PBS и замораживали в жидком азоте. Поперечные срезы толщиной 20 мкм через грудной отдел насекомых получали при помощи криотома Microm HM 520. В дальнейшем криосрезы блокировали в 1% растворе BSA на TTBC (50 мМ Tris-HCl, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 0.05% Tween-20), инкубировали с кроличьей антисывороткой к протеиназе rGHP3e1 в течение ночи при температуре 4°C, от-

мывали TTBC и инкубировали с антикроличьим флюоресцентным конъюгатом Alexa Fluor546 (Life Technologies) в течение 2 часов. Готовые препараты просматривали на флюоресцентном микроскопе Carl Zeiss AxioImager M1.

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) белков проводили в пластинах 5% полиакриламидного геля (ПААГ) со смесью амфолин с конечным диапазоном pH от 5 до 11 на приборе Multiphor II (LKB) при расстоянии между электродами 10 см или в пластинах Phast Gel pH 5–8 на приборе PhastSystem (Pharmacia) при расстоянии между электродами 5 см [Конарев и Фомичева, 1991; Konarev and Lovegrove, 2012]. При фракционировании препаратов протеиназ на гель в области анода с помощью бумажных полосок наносили по 0.2–3 мкл препаратов анализируемых белков. После ИЭФ протеиназы выявляли с помощью двух вариантов метода субстратной реплики. Один основан на гидролизе слоя растворимой в уксусной кислоте фракции глютеина, закрепленной на пластиковой подложке [Конарев и др. 2013], другой – на гидролизе фракции белков клейковины, растворимых в 70% этаноле. Электрофорез белков с додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГЭ) проводили в пластинах гомогенных 12% или градиентных (8–25 и 10–15%) полиакриламидных гелей с последующим окрашиванием красителями Кумасси (R-250 или G-250).

Для проведения ДСН-ПААГЭ и иммуноблоттинга пробы белков смешивали с равным объемом 125 мМ Tris-HCl буфера, содержащего 4% ДСН, 10% 2-меркаптоэтанола, 20% глицерина и инкубировали в течение 10 мин при 95°C. Белки разделяли с помощью ДСН-ПААГЭ в 12% геле с использованием камеры Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, США) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану того же производителя с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot® согласно инструкции. Мембраны блокировали в течение часа в присутствии TTBC, 1% BSA и инкубировали с разбавленными тем же раствором 1:50 scFv-фрагментом или 1:1000 поликлональными антителами (кроличьими или мышинными иммунными сыворотками к rGHP3e1) в течение ночи при 4°C. После отмывки в TTBC мембраны инкубировали 2 часа при комнатной температуре с разведенными 1:4000 в TTBC антителами, специфичными к IgG кролика или мыши и конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США). Мембраны, обработанные scFv-фрагментом, перед инкубацией с пероксидазными конъюгатами были также обработаны моноклональными антителами к полигистидиновой последовательности, разведенными 1:2000 в том же растворе. После очередной отмывки в TTBC мембрану инкубировали в свежеприготовленном растворе для проявления пероксидазной реакции, содержащем ТБС, 15% метанол, 0.05% 4-хлоро-1-нафтол (Sigma, США) и 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Для проведения иммуноблоттинга в сочетании с ИЭФ после разделения на гель накладывали нитроцеллюлозную мембрану, которую затем заменяли субстратной репликой. Мембрану обра-

батывали антителами и проявляли также как и после ДСН-ПААГЭ.

Для анализа способности протеиназ клопов гидролизовать различные фракции запасных белков к 1 мг муки из неповрежденного зерна сорта Gaspard добавляли 10 мкл раствора испы-

туемого препарата фермента с различной степенью разведения в 20 мМ трис-НСl буфере рН 8.5 и инкубировали смесь в течение 16 часов при 37°C. После центрифугирования 0.9 мкл надосадочной жидкости наносили на гель для ДСН-ПААГЭ.

### Результаты и их обсуждение

Слюнные железы клопа вредная черепашка, а также поврежденные им зерна пшеницы содержат сложный набор протеолитических ферментов, что видно из результатов ИЭФ белков насекомого и зерна с последующим выявлением протеиназ по активности с помощью субстратных реплик (рис. 1А, 2А, 4Г). Протеиназы различаются как по ИЭТ (рI) компонентов, так и по субстратной специфичности. Нейтральные протеиназы (НП) с ИЭТ в интервале приблизительно от 6 до 7.5 единиц рН, по-видимому, играющие ведущую роль в гидролизе белков клейковины, не действовали на животный белок желатин. Щелочные протеиназы (ИЭТ от 7.5 до 10) гидролизовали как запасные белки, так и желатин (рис. 3Г). Однако оставалась неясной степень соответствия протеиназ, выявляемых в поврежденном зерне и в слюнных железах. Кроме того, были выявлены существенные отличия по протеолитической активности между образцами слюнных желез, собранными в разных регионах и в разные годы при, в целом, относительно невысоком ее уровне. Так, интенсивность полос в спектре протеиназ, выделенных из слюнных желез клопов, собранных в Краснодарском крае в 2013 году (рис. 1, дорожка 3), существенно ниже, чем в спектрах ферментов из препаратов того же происхождения 2015 года (дорожка 5) или препаратов из Саратовской области 2006 года (дорожка 4) протеиназ. Это обстоятельство требовало объяснения, поскольку для осуществления внекишечного пищеварения и усвоения белков зерна клопам необходимы большие количества активных протеиназ. Известно, что уровень секреции и состав пищеварительных ферментов у насекомых определяется наличием и типом пищи. В отношении КВЧ оставалось невыясненным, происходит ли синтез соответствующих протеиназ в слюнных железах

непосредственно при питании на зерне или осуществляется мобилизация их возможных запасов.

Для решения данного вопроса был применен метод иммуноблоттинга. Ранее нами из поврежденного клопом зерна была выделена протеиназа с молекулярной массой 28 кДа. Соответствующая ей кДНК была клонирована [Konarev et al., 2011], а затем экспрессирована в клетках микроорганизмов [Конарев и др., 2014; Долгих и др., 2014]. На форму, экспрессированную в клетках бактерии *E.coli* (rGHP3e1), путем иммунизации кроликов были получены поликлональные антитела [Долгих и др. 2014]. Позднее на основе варибельных фрагментов иммуноглобулинов мышей, иммунизированных данной рекомбинантной протеиназой, была сконструирована библиотека одноцепочечных антител (scFv-фрагментов) и отобрано мини-антитело, специфичное к изучаемому ферменту [Долгих и др., 2017]. Белки, выделенные из неповрежденного и поврежденного зерна пшеницы (рис.1 дорожки 1 и 2), трех образцов слюнных желез (дорожки 3–5), а также кишечника клопов (дорожка 6) были разделены методом ИЭФ. С гелей были сняты реплики на нитроцеллюлозные мембраны, а затем на гели наложили субстратные реплики с запасными белками зерна и инкубировали их до выявления протеиназ. Нитроцеллюлозные мембраны были обработаны поликлональными антителами к протеиназе rGHP3e1 (рис. 1В) или выделенным scFv-фрагментом (рис. 1Г). В ходе эксперимента было показано, что оба варианта антител не реагировали с белками неповрежденного и поврежденного зерна, но взаимодействовали с белками слюнных желез, причем интенсивность окраски компонентов спектров белков всех трех образцов слюнных желез была сопоставимой (рис. 1В, Г, дорожки 3–5), в отличие от спектров протеиназ, выделен-

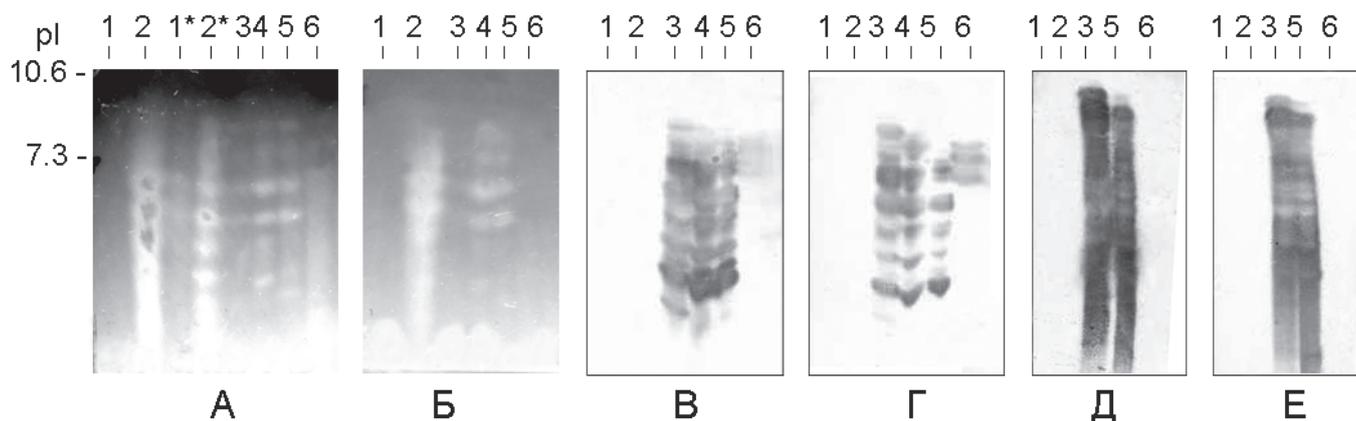


Рисунок 1. Анализ протеолитической активности и иммунохимической специфичности фракций белков вредной черепашки и поврежденного зерна, разделенных изоэлектрическим фокусированием.

Дорожки 1 и 2 – белковые экстракты неповрежденного и поврежденного зерна сорта Eg-88; 1\* и 2\* – слабо поврежденное и сильно поврежденное зерно сорта Джангаль; 3–5 – слюнные железы взрослых особей клопов, собранных на созревающей пшенице летом 2013, 2015 (Краснодарский край) и 2006 (Саратовская область) гг.; 6 – кишечника клопов, Саратовская область (2006 г.). А. После ИЭФ белков на гель наложена субстратная реплика и выявлены протеиназы (контроль). Б и В. После ИЭФ с геля снята реплика на нитроцеллюлозную мембрану (В), а затем на гель наложена субстратная реплика (Б). Г. Нитроцеллюлозная реплика с геля, аналогичного Б. Д и Е – нитроцеллюлозные реплики с гелей с экстрактами № 1, 2, 3, 5 и 6. Нитроцеллюлозные мембраны обработаны поликлональными антителами кролика к рекомбинантной протеиназе rGHP3e1 (В), scFv-фрагментами антител к rGHP3e1 (Г) и поликлональными антителами кролика и мыши к гомогенату слюнных желез клопа (Д и Е).

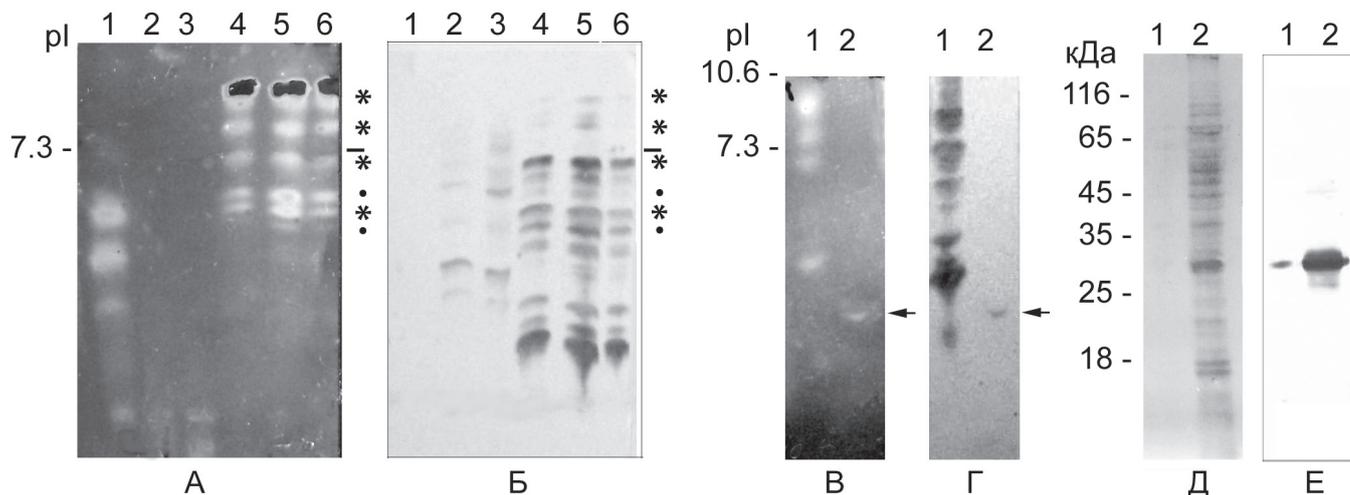


Рисунок 2. Анализ протеолитической активности и иммунохимической специфичности фракций белков слюнных желез вредной черепашки и поврежденного зерна, разделенных изоэлектрическим фокусированием (А-Г) и ДСН-ПААГЭ (Д-Е). Протеиназы выявлены глютеиновыми репликами (А и В), нитроцеллюлозные мембраны обработаны поликлональными антителами к рекомбинантной протеиназе гGHP3e1 (Б, Г и Е), белки окрашены красителем Понсо R-250 (Д). А и Б. ИЭФ в геле с амплинами рН 5–8. Дорожка 1 – белки зерна, поврежденного вредной черепашкой; 2 и 3 – экстракты кишечника черепашки, 4–6 – экстракты слюнных желез. «\*» и «.» – близкие по рI компоненты на глютеиновой реплике и нитроцеллюлозной мембране. В и Г. ИЭФ в Phast-геле рН 5–8. 1 – экстракт слюнных желез; 2 – рекомбинантная протеиназа гGHP3p1. Положения протеиназы указаны стрелками. Д и Е. ДСН-электрофорез в 12% ПААГ. 1 и 2 – экстракт слюнных желез. На дорожку 1 нанесено в 20 раз меньше экстракта, чем на дорожку 2.

ных из тех же образцов (рис. 1Б, дорожки 3–5). Антитела обоих типов реагировали также с рядом компонентов белков кишечника (рис. 1В, Г, дорожка 6). Менее четкие спектры протеиназ на реплике Б (рис. 1) по сравнению с репликой А, наложенной непосредственно после ИЭФ белков и использованной для сравнения, объясняются тем, что она была получена после снятия нитроцеллюлозной реплики В, что привело к снижению концентрации белков в геле и некоторой размытости полос. В свою очередь, проявление аналогичных нитроцеллюлозных реплик поликлональными антителами к гомогенату слюнных желез не выявило каких-либо антигенов в поврежденных зернах (рис. 1Д, Е, дорожка 2) или кишечнике клопов (рис. 1Д, Е, дорожка 6), в отличие от белков самих слюнных желез (рис. 1Д, Е, дорожки 3, 5).

Фракционирование белков с более высоким разрешением предоставляет лучшую возможность для сопоставления спектров протеиназ слюнных желез, выявленных по активности к глютеинам зерна, использованным в субстратной реплике (рис. 2А), со спектрами компонентов антигенов, содержащихся в слюнных железах и реагирующих с поликлональными антителами к гGHPe1 (рис. 2Б). Очевидно, что, хотя некоторые компоненты на субстратной и нитроцеллюлозной репликах совпадают (отмечены на рисунке звездочками), многие компоненты активных протеиназ и антигенов отличаются между собой по ИЭТ (рис. 2А, Б, дорожки 3–6). Антигены, распознаваемые антителами к гGHPe1, присутствовали и в спектрах белков кишечника (рис. 2А, дорожки 2 и 3), но не выявлялись в белках поврежденного зерна (рис. 2А, дорожка 1). Поликлональные антитела к гGHP3e1 реагировали с компонентом рекомбинантной протеиназы гGHP3p1, экспрессированной в дрожжах (рис. 2 В, Г, дорожка 2), а также с рекомбинантной протеиназой гGHP3p2. Использование данных антител в сочетании с ДСН-ПААГЭ показало от-

носительно высокое содержание соответствующего антигена в спектре белков слюнных желез (рис. 2Д и 2Е).

По всей видимости, данный фермент накапливается в значительных количествах в слюнных железах клопа в виде секреторных гранул. Иммунофлуоресцентное окрашивание слюнных желез КВЧ (фрагментов поперечных срезов имаго клопа на уровне груди) с использованием поликлональных антител кролика к рекомбинантной протеиназе гGHP3e1 и антикроличьего флуоресцентного конъюгата в качестве вторичных антител выявило наличие небольших светлых округлых структур, по-видимому соответствующих секреторным гранулам в клетках желез (рис. 3).

Ранее нами было установлено, что протеиназа GHP3 синтезируется в слюнных железах вредной черепашки в

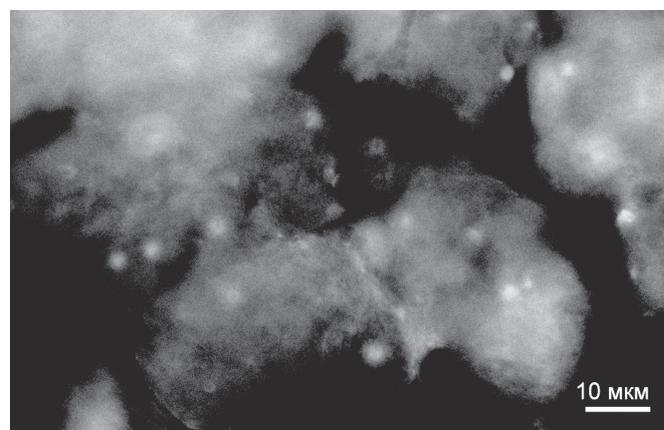


Рисунок 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание слюнных желез клопа вредная черепашка (поперечный срез имаго клопа на уровне груди) с использованием поликлональных антител кролика к рекомбинантной протеиназе гGHP3e1 и антикроличьего флуоресцентного конъюгата (вторичные антитела)

виде полипептида, состоящего из сигнальной последовательности, пропептида и зрелого фермента [Konarev et al., 2011]. Сигнальные пептиды секреторных белков, к которым относятся и пищеварительные протеиназы, отщепляются в процессе их транслокации в просвет эндоплазматического ретикулума, а оставшаяся неактивная часть требует отделения пропептида от зрелого фермента для его активации. В природе такой гидролиз осуществляют специальные протеиназы. Путем гетерологической экспрессии в дрожжах нуклеотидной последовательности, соответствующей зрелому ферменту, мы получили активную форму протеиназы gGHP3p1, а экспрессией последовательности, кодирующей пропептид совместно со зрелым ферментом, мы получили соответствующий неактивный профермент (зимоген) [Долгих и др., 2014]. Информация о его аминокислотной последовательности, а именно, наличие остатка аргинина в позиции, предшествующей зрелой форме фермента, позволила нам предположить, по аналогии с некоторыми другими сериновыми протеиназами [Takayama et al., 1997], что отщепление пропептида может быть осуществлено какой-либо протеиназой, специфичной к пептидным связям, образованным аргинином. Такими протеиназами являются трипсины различных животных, в частности коммерческий препарат трипсина быка. С использованием иммобилизованного на полиакриламидом геле трипсина нам удалось отщепить пропептид и получить активную рекомбинантную форму протеиназы gGHP3p2. В данном исследовании мы предположили, что относительно низкая активность протеиназ с молекулярной массой 28 кДа в слюнных железах клопа может объясняться пребыванием фермента в неактивной форме. Для выяснения этого вопроса белки, экстрагированные из слюнных желез, были обработаны иммобилизованным трипсином с использованием различных вариантов со-

отношения реагентов и продолжительности инкубации. Результаты анализировались методом ИЭФ в сочетании с глютеиновой репликой (рис. 4А). Выяснилось, что обработка трипсином приводит к появлению в спектрах протеиназ новых мощных компонентов (рис. 4А, дорожки 3 и 4), существенно превышающих по активности те, что присутствуют в необработанных трипсином препаратах (рис. 4А, дорожки 1, 2 и 6). Темные полосы указывают на полный гидролиз субстрата в соответствующих зонах реплики, тогда как компоненты с меньшей активностью дают белые полосы, опалесцирующие в рассеянном свете. Оптимальные результаты были получены при добавлении 1 мг сухого геля с иммобилизованным трипсином к 30 мкл экстракта из слюнных желез с рН 8.5 и продолжительности инкубации 2 часа при температуре 37°C. Увеличение продолжительности инкубации приводило к падению протеолитической активности. Резкое нарастание активности при обработке трипсином наблюдалось как для нейтральных протеиназ, гидролизующих клейковину (рис. 4А), так и щелочных протеиназ, гидролизующих также желатин (рис. 4Г, дорожки 14 и 15). Контрольная проба с гелем иммобилизованного трипсина без добавления экстракта слюнных желез не содержала свободных протеиназ, что указывает на то, что сам трипсин не вносил вклад в увеличение протеолитической активности препаратов. Сопоставление данных ИЭФ белков слюнных желез в сочетании с субстратными репликами (рис. 4 Б) и иммуноблоттинга с использованием scFv-фрагмента (рис. 4В), а также поликлональных антител к gGHP3e1 выявили перестройку спектра антигенов. При этом вновь появившиеся активные компоненты нейтральных протеиназ (рис. 4Б, дорожка 10) соответствовали отдельным, несколько усиленным компонентам антигенов на нитроцеллюлозной реплике (рис. 4В, 10). Иммуноблоттинг с использованием

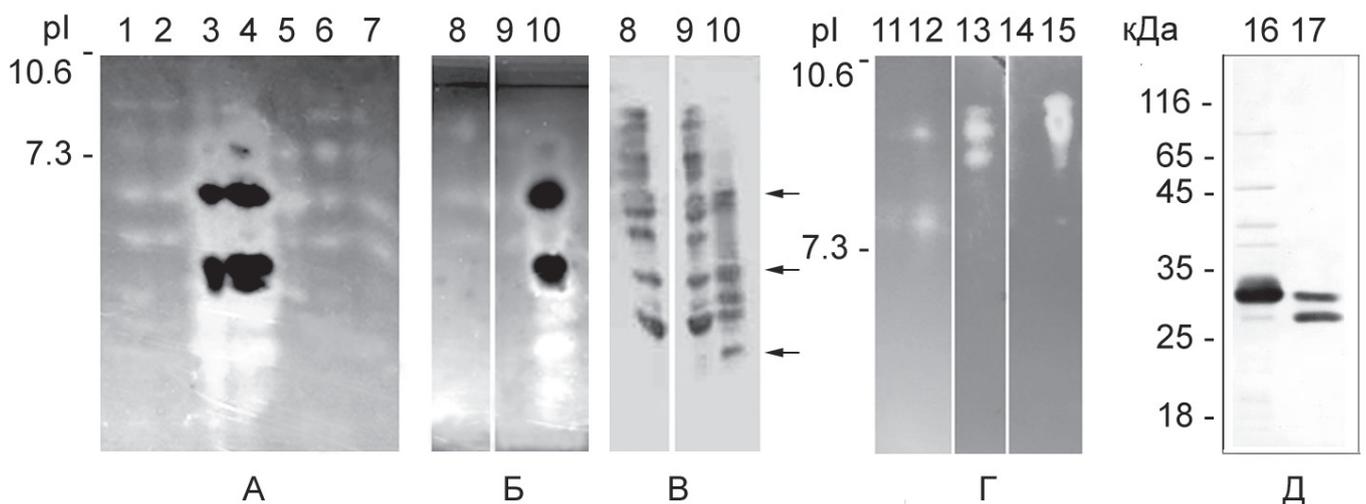


Рисунок 4. Активация протеиназ слюнных желез вредной черепашки под действием иммобилизованного трипсина.

Белки поврежденного зерна и слюнных желез вредной черепашки разделены изофокусированием (А-В – интервал рН 5–8, Г – рН 5–11) и ДСН-ПААГЭ (Д). Протеиназы выявлены субстратными репликами (А и Б – спирторастворимые белки клейковины, Г – желатин), В и Д – иммуноблоттинг с использованием scFv-фрагмента к рекомбинантной протеиназе gGHP3e1.

А. Дорожки 1–6 – белки слюнных желез без обработки (1, 2, 5 и 6) и после обработки трипсином (3–6). 7 – белки зерна пшеницы образца сорта Еге-88, поврежденного вредной черепашкой.

Б и В – реплики, последовательно снятые с одного и того же геля; 8–10 – белки слюнных желез без обработки (8 и 9) и после обработки трипсином (10). Новые или усилившиеся компоненты спектра антигенов (10) указаны стрелками.

Г. 11–13 – белки поврежденных зерен образцов сортов Джангаль (11 и 12, нанесено 1 и 3 мкл соответственно) и Еге-88 (13, 3 мкл); 14 и 15 – белки слюнных желез без обработки и после обработки трипсином.

Д. 16 и 17 – белки слюнных желез без обработки и после обработки трипсином.

scFv-фрагмента выявил заметное ослабление компонента антигена с молекулярной массой около 30–32 кДа и резкое усиление компонента с молекулярной массой около 28 кДа после обработки экстрактов слюнных желез трипсином (рис. 4Д, 16 и 17). По-видимому, более высокомолекулярный компонент соответствует проферменту, а компонент 28 кДа – зрелому ферменту. В следовых количествах компонент 28 кДа присутствует и в необработанном экстракте слюнных желез.

С помощью ДСН-ПААГЭ был изучен характер гидролиза компонентов клейковины – запасных белков глютеинов и глиадинов зерна пшеницы разными препаратами протеолитических ферментов вредной черепашки, выделенными из поврежденного зерна и слюнных желез, а также оценен уровень повышения протеолитической активности в экстрактах слюнных желез после обработки трипсином.

К навескам (1 мг) муки из неповрежденного зерна мягкой пшеницы сорта Gaspard добавляли экстракты белков, выделенных из поврежденного зерна образца сорта твердой пшеницы Ege-88, а также препараты белков слюнных желез, как необработанные, так и обработанные иммобилизованным трипсином. Мука сорта Gaspard была выбрана потому, что характерные для сорта высокомолекулярные глютеины показали высокую атакуемость протеиназами клопов по сравнению с глютеинами других сортов пшеницы, что обеспечило повышенную чувствительность анализа. После инкубации в течение 17 часов при 37 °С пробы наносили на гель для ДСН-ПААГЭ (рис. 5). Очевидно, что препарат протеиназ, выделенных из поврежденного зерна образца пшеницы сорта Ege-88 (рис.5, дорожка 2), в условиях эксперимента гидролизовал практически все компоненты глютеинов (высокомолекулярные фракции белков спектра) и глиадинов (относительно низкомолекулярные фракции). Остались лишь следы некоторых компонентов с молекулярной массой около 67 кДа.

Протеиназы, экстрагированные из слюнных желез клопов, собранных в разные годы в Саратовской области и Краснодарском крае, обладали относительно невысокой активностью и в условиях данного эксперимента практически не гидролизовали запасные белки (рис. 5, 4–6). В свою очередь, препараты протеиназ, обработанные иммобилизованным трипсином, показали высокую активность по отношению ко всем фракциям запасных белков, включая высокомолекулярные глютеины и глиадины. Контрольные пробы показали, что протеолитическая активность не связана непосредственно с самим трипсином, который теоретически мог частично сойти с носителя. Протеолитическая активность наблюдалась даже при использовании для инкубации количеств экстрактов в 50 раз меньших, чем в случае примеров с необработанными препаратами, представленными на рис. 5. Объемы обработанного препарата белков слюнных желез, соответствующего 1/10 от объема исходного необработанного препарата, оказалось достаточно для гидролиза практически всех белков в пробе. Таким образом, активность протеиназ в белковых экстрактах из слюнных желез после обработки их трипсином возрастает не менее чем на два порядка. Кроме того установлено, что протеиназы слюнных желез, активируемые обработкой иммобилизованным трипсином, способны гидролизовать все основные фракции запасных белков

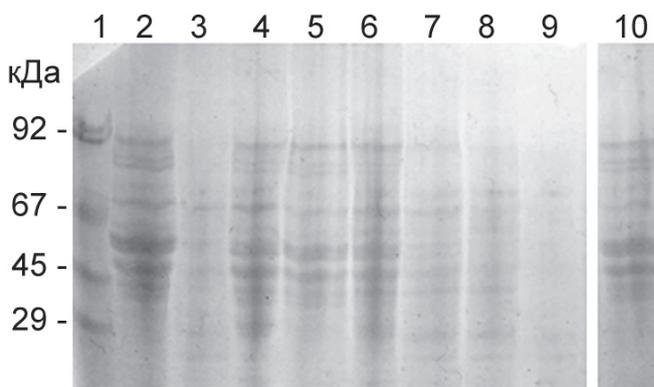


Рисунок 5. Гидролиз запасных белков неповрежденного зерна пшеницы сорта Gaspard. (дорожки 2 и 10, контроль) протеиназами вредной черепашки, извлеченными из поврежденного зерна сорта Ege-88 (дорожка 3) и белками слюнных желез необработанными (4–6) и обработанными (7–9) трипсином. К белкам неповрежденного зерна добавляли протеиназы (3–9) или 0.02 М трис-НСl буфер (2 и 10), инкубировали смеси 17 часов при 37 °С и наносили на гель для ДСН-ПААГЭ в объеме 0.9 мкл. Объем обработанных иммобилизованным трипсином препаратов белков слюнных желез (7–9) в пересчете составлял 1/50, 1/25 и 1/10 соответственно от объема исходного необработанного препарата, нанесенного на дорожку 6. 4 – с добавлением препарата слюнных желез клопов из Саратовской области (сбор 2006 года), 5 и 6 – из Краснодарского края (2015 год). Дорожка 1 – маркеры молекулярной массы.

зерна, как и протеиназы, содержащиеся в зерне, поврежденном вредной черепашкой.

Анализ нативных и рекомбинантных белков слюнных желез клопа вредная черепашка и поврежденных зерен пшеницы с помощью ДСН-ПААГЭ и ИЭФ в сочетании с методами субстратных реплик и иммуноблоттинга позволил оценить сложность состава комплекса протеолитических ферментов, участвующих во внекишечном пищеварении вредителя, и выявить ряд новых закономерностей его функционирования. С помощью иммунохимических подходов прямо показано присутствие протеиназы GHP3 в слюнных железах в форме неактивного профермента (зимогена), хранящегося, видимо, в секреторных гранулах. Это подтверждает высказанное нами ранее предположение, основанное на данных, полученных с помощью аффинной хроматографии и электрофореза протеиназ слюнных желез и поврежденного зерна (Конарев и др., 2014). Существование протеолитических ферментов в форме неактивных проферментов с активацией при возникновении необходимости – при питании, запуске каскада защитных реакций на нападение патогенов и т.д. широко известно у многих организмов, включая некоторых насекомых, но пока не было изучено у хлебных клопов. При поступлении в слюнные железы, например, таракана сигнала по нервной системе и с участием нейромедиатора серотонина [Walker, 2009] происходит выделение содержимого секреторных гранул из клеток в выводящие пути, после чего осуществляется активация проферментов. По аналогии с известными пищеварительными протеиназами млекопитающих и насекомых можно предположить, что при появлении адекватной пищи – зерна злаков, по сигналу, переданному нервной системой и нейрогормональными факторами, в слюнных железах вредной черепашки синтезируется или активируется какая-то пока неизвестная се-

риновая протеиназа, которая, в свою очередь, активирует профермент протеиназы GHP3, а также активаторы других протеиназ, в частности щелочных. У млекопитающих таким ферментом является энтерокиназа, которая превращает трипсиноген в активный трипсин, который затем сам осуществляет активацию других молекул трипсиногена [Яровая, 2003]. У чешуекрылых такими активирующими ферментами в кишечнике служат трипсиноподобные протеиназы [Parde, 2009]. Наши эксперименты показали, что активатором профермента протеиназы GHP3 в слюнных железах вредной черепашки может быть протеиназа со специфичностью, как у трипсина. Сам профермент протеиназы GHP3, по-видимому, не может активироваться автокатализом ввиду ее иной, отличной от трипсина, субстратной специфичности. По данным Amiri et al. [2015], питание зерном пшеницы запускает синтез мРНК, кодирующих наряду с другими ферментами протеиназу GHP3 (в их работе, обозначенной как G1), причем как в слюнных железах, так и, в меньшей степени, в кишечнике. Наши данные по иммунохимии также свидетельствуют о присутствии антигена, соответствующего GHP3, в кишечнике клопа. Интересно, что уровень экспрессии мРНК при питании зернами ржи, тритикале и ячменя был значительно ниже, чем при питании зернами пшеницы [Amiri et al., 2015], что, возможно, свидетельствует о большей функциональной направленности GHP3 (G1) на гидролиз запасных белков пшеницы. По-видимому, при питании зерном пшеницы, в зависимости от уровня потребности в ферменте, в слюнных железах клопа могут идти независимо или взаимосвязанно один или два процесса – синтез фермента *de novo* и активация зимогена (мобилизация запасов). В любом из этих случаев процесс проходит стадию активации протеиназы. Ключевая роль фермента, запускающего активацию пищеварительной протеиназы, указывает на один из возможных путей борьбы с вредителем. Если сама протеиназа GHP3 не чувствительна к известным белковым ингибиторам [Konarev et al., 2011; Долгих и др., 2014], то трипсиноподобная протеиназа, активирующая ее профермент, может оказаться подходящей мишенью для ингибиторов, по крайней мере ее кишечная форма. Уже установленная возможность использования такого подхода в борьбе с чешуекрылыми [Parde, 2009] указывает на перспективность поиска и изучения протеиназ, активирующих проферменты GHP3 и других пищеварительных протеиназ вредной черепашки.

Полученные данные также свидетельствуют о том, что обработка белков слюнных желез трипсином, помимо нейтральной протеиназы GHP3, способной гидролизовать запасные белки пшеницы, активирует и щелочные протеиназы, гидролизующие как белки клейковины, так и желатин. Эти данные указывают на то, что и щелочные протеиназы клопа могут находиться в форме зимогена. Щелочные протеиназы, присутствующие также в поврежденных зернах, проявляют более высокую изменчивость по составу компонентов ИЭФ спектра по сравнению с нейтральными протеиназами, что может указывать, на

пример, на внутривидовую изменчивость клопов по составу секретируемых щелочных протеиназ или на зависимость состава таких ферментов от сортовых особенностей белков зерна, которым питается клоп.

Трудно интерпретируемым результатом является то, что в описанных условиях эксперимента в поврежденном зерне не было выявлено антигенов, реагирующих с разными типами антител к рекомбинантной протеиназе GHP3, хотя нуклеотидная последовательность, кодирующая GHP3, была клонирована на основании данных секвенирования протеиназы 28 кДа, выделенной из поврежденного зерна [Konarev et al., 2011]. Среди возможных объяснений – недостаточная чувствительность использованных методов (локализацию иммунных комплексов проводили после ИЭФ) и низкая концентрация секретируемой формы GHP3 в зерне. Возможно, что GHP3, характеризующаяся высоким содержанием в слюнных железах клопа (в форме зимогена) после секреции в зерно в значительной мере деградирует в ходе его созревания в отличие от ряда других форм протеиназ, сохраняющих активность в поврежденном зерне в течение длительного времени. То же, видимо, происходит и с пролил-специфичной эндопептидазой, синтезирующейся в слюнных железах черепашки, но представленной в поврежденном зерне лишь в следовых количествах [Yandamuri et al., 2014]. Не было выявлено и взаимодействия поликлональных антител к гомогенату слюнных желез, полученных в кроликах и мышах, с белками поврежденного зерна или кишечника клопа. По-видимому, несмотря на относительно высокое содержание в слюнных железах секретируемые в зерно белки, включая протеиназы, в присутствии множества других белков гомогената, обладающих более высокой иммуногенностью, не проявляли достаточной способности вызывать иммунный ответ. Поскольку другими авторами [Гаврилюк и др., 1975; Vaccino et al., 2016] была показана возможность иммунодиагностики повреждения зерна клопами, основанной на использовании антител к белкам слюнных желез, можно предположить, что условия осуществления иммунизации, особенности используемого для иммунизации материала и т.д. могут влиять на конечный результат. Выходом из данной ситуации может быть стандартизация условий анализа. Получение высокоспецифичных моноклональных антител к конкретным белкам, секретируемым слюнными железами, в том числе одноцепочечных scFv-фрагментов антител к протеиназе GHP3 и другим секретируемым ферментам, а также использование более эффективных методов фракционирования белков в сочетании с высокочувствительными вариантами выявления иммунных комплексов может быть решением данной проблемы [Долгих и др., 2017]. Такие подходы расширят арсенал эффективных методов анализа пищеварительных ферментов вредителей, а также будут полезны при разработке новых, более достоверных по сравнению с существующими, методов диагностики повреждения растений вредителями.

#### Заключение

Методами ДСН-ПААГЭ и ИЭФ в сочетании с методами иммуноблоттинга и субстратных реплик оценена сложность состава комплекса протеолитических фермен-

тов, участвующих во внекишечном и внутрикишечном пищеварении клопа вредная черепашка, и выявлен ряд особенностей его функционирования. Обнаружено, что

слюнные железы клопа и поврежденные зерна пшеницы содержат ряд компонентов протеиназ, отличающихся по ИЭТ и субстратной специфичности. Нейтральные протеиназы, выявленные в поврежденных зернах и, по-видимому, играющие ведущую роль в гидролизе белков клейковины, не действуют на животный белок желатин, тогда как щелочные протеиназы гидролизуют как запасные белки, так и желатин.

С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии установлено присутствие протеиназы GHP3, способной гидролизовать белки клейковины пшеницы, в секреторных гранулах клеток слюнных желез клопа вредная черепашка в форме неактивного профермента. Показана возможность активации проферментов протеиназы GHP3, а также других протеиназ, содержащихся в слюнных же-

лезях клопа, обработкой иммобилизованным трипсином. Полученные данные позволяют предположить наличие в слюнных железах протеиназ, осуществляющих активацию проферментов *in vivo* при поступлении сигнала о наличии соответствующей белковой пищи. Подобные активирующие протеиназы, присутствующие как в слюнных железах, так и в кишечнике клопов, наряду с самими пищеварительными ферментами, также могут рассматриваться в качестве потенциальных “мишеней” для белковых ингибиторов при создании устойчивых к вредителю форм пшеницы. Поликлональные антитела и одноцепочечные scFv-фрагменты антител могут являться эффективными инструментами для изучения пищеварительных протеиназ хлебных клопов, а также разработки новых подходов к защите пшеницы от данных вредителей.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-08-04247).

### Библиографический список (References)

- Вилкова Н.А., Экман-Буринская Н.В. Некоторые аспекты белкового питания вредной черепашки *Eurygaster integriceps* Put. на различных по устойчивости сортах пшеницы // Труды ВИЗР. 1977. N 52. С. 39–44.
- Гаврилюк И.П., Конярев В.Г., Шапиро И.Д., Вилкова Н.А., Семенова А.Я., Литвинов А.М. Способ определения поврежденности зерна и муки пшеницы вредителями // Бюлл. открытий, изобретений, пром. образцов и товарных знаков. 1975. N 38. А.с. N 487627.
- Долгих В.В., Сендерский И.В., Конярев А.В. Получение и свойства рекомбинантных протеиназ *Eurygaster integriceps* Put., гидролизующих глютен // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. N. 5. P. 466–474.
- Долгих В.В., Царев А.А., Сендерский И.В., Тимофеев С.А., Конярев А.В. Рекомбинантные одноцепочечные антитела как инструмент для выявления и изучения глютен-гидролизующих протеиназ клопа вредная черепашка (*Eurygaster integriceps* Put.) // Вестник защиты растений. 2017 N 1. С. 21–26.
- Капусткина А.В., Нефедова Л.И. Прорастание и морфогенез семян пшеницы при повреждении вредной черепашкой // Вестник защиты растений. 2013. N 2. С. 48–55.
- Конярев Ал.В., Конярев А.В., Нефедова Л.И., Губарева Н.К., Д.Сиври Озай. Анализ полиморфизма гидролизующих клейковину протеиназ в зерновках пшеницы, поврежденных вредной черепашкой *Eurygaster integriceps* Put. и родственными ей клопами // Доклады РАСХН. 2013. N 5. P. 7–11.
- Конярев Ал.В., Фомичева Ю.В. Перекрестный анализ взаимодействия компонентов  $\alpha$ -амилазы и протеиназ насекомых с белковыми ингибиторами из эндосперма пшеницы // Биохимия. 1991. Т.56. N 4. С.628–638.
- Конярев А.В., Долгих В.В., Сендерский И.В., Нефедова Л. И., Конярев Ал. В., Губарева Н. К. Свойства нативных и рекомбинантных протеиназ слюнных желез клопа вредная черепашка (*Eurygaster integriceps* Put.), гидролизующих клейковину пшеницы // Вестник защиты растений. 2014. N 2. С. 3–16.
- Мосолов В.В., Валуева Т. А. Ингибиторы протеиназ в биотехнологии растений // Прикл. биохим. и микробиол. 2008. Т. 44. N 3. P. 261–269.
- Павлюшин В.А., Вилкова Н.А., Сухорученко Г.И., Нефедова Л.И., Капусткина А.В. Вредная черепашка и другие хлебные клопы. Санкт-Петербург.: 2015. 280 с.
- Яровая Г. А. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза // Лабораторная медицина. 2003. N 6. С. 48–54.
- Every D., Sutton K.H., Shewry P.R., Tatham A.S., Coolbear T. Specificity of action of an insect proteinase purified from wheat grain infested by the New Zealand wheat bug, *Nysius huttoni* // J. Cereal Sci. 2005. V. 42. P. 185–191.
- Jamal F., Pandey P.K., Singh D., Khan M.Y. Serine protease inhibitors in plants: nature’s arsenal crafted for insect predators // Phytochemistry Reviews. 2012. P. 1–34. doi: 10.1007/s11101-012-9231-y
- Konarev A.V., Beaudoin F., Marsh J., Vilkova N.A., Nefedova L.I., Sivri D., Koxsel H., Shewry P.R., Lovegrove A. Characterization of a glutenin-specific serine proteinase of sunn bug *Eurygaster integriceps* Put // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. V. 59. N. 6. P. 2462–2470.
- Konarev A.V., Lovegrove A. Novel detection methods used in conjunction with affinity chromatography for the identification and purification of hydrolytic enzymes or enzyme inhibitors from insects and plants, *Affinity Chromatography*, Magdeldin, S., Ed., InTech, 2012, pp. 188–210. ISBN: 978-953-51-0325-7. DOI: 10.5772/37618. Available from: <http://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography/novel-detection-methods-used-in-conjunction-with-affinity-chromatography-for-the-identification-and-> (accessed: 29.01.2017)
- Lait C. G., Miller D.R., Bates, S.L., Borden J.H., Kermode A.R. Biochemical assay detects feeding damage to loblolly pine seeds caused by the leaffooted pine seed bug (Hemiptera: Coreidae) // Journal of Entomological Science. 2003. V. 38. N. 4. P. 644–653.
- Olanca B., Koxsel H., Ozderen N.T., Ozay, D.S. Determination of wheat bug (*Eurygaster* spp.) damage in durum wheat (*Triticum durum* L.) by electrophoresis and rapid visco analyser. *Journal of Cereal Science*. 2016. V. 72. P. 69–74.
- Parde V. D. Inhibition of *Helicoverpa armigera* gut zymogen activation by plant protease inhibitors (Doctoral dissertation, Dr. Babasaheb Ambedkar Marathwada University). 2009. 204 p. [http://oar.icrisat.org/128/1/merged\\_document-3.pdf](http://oar.icrisat.org/128/1/merged_document-3.pdf) (Accessed 09.12.2016)
- Salis L., Goula M., Valero J., Gordún E. Prolamin proteins alteration in durum wheat by species of the genus *Eurygaster* and *Aelia* (Insecta, Hemiptera) // Spanish journal of agricultural research. 2010. V.8. N 1. P. 82–90.
- Shamsi, T. N., Parveen R., Fatima S. «Characterization, Biomedical and Agricultural applications of Protease Inhibitors: A review // International journal of biological macromolecules. 2016. V. 91.P. 1120–1133.
- Sivri D., Koxsel H. Characterisation and partial purification of gluten hydrolysing proteinase from bug (*Eurygaster* spp.) damaged wheat // In Wheat Gluten, Royal Society of Chemistry: London. 2000. P. 526–530.
- Takayama T.K., Fujikawa K., Davie E.W. Characterization of the precursor of prostate-specific antigen activation by trypsin and by human glandular kallikrein // *Journal of Biological Chemistry*. 1997. V. 272. N 34. P. 21582–21588.
- Vaccino P., Ingegno B., Pansa M., Copta T., and Tavella L. Common wheat and cereal bug interactions: kernel quality depletion and immunodetection of damage // *The Journal of Agricultural Science*. 2016. P. 1–12. doi: 10.1017/S0021859616000162.
- Walker G. P. Salivary glands // In V. H. Resh, R. T. Carde ed. *Encyclopedia of Insects*. 2009. Elsevier. P. 897–901.
- Yandamuri R.C., Gautam R., Darkoh C., Daredy V., El-Bouhssini M., Clack B. A. Cloning, expression, sequence analysis and homology modeling of the prolyl endoprotease from *Eurygaster integriceps* Put. // *Insects*. 2014. V. 5. N. 4. P. 762–782.

### Translation of Russian References

- Dolgikh V.V., Senderskii I.V., Konarev A.V. Production and properties of recombinant glutenin-hydrolyzing proteinases from *Eurygaster integriceps* Put. *Applied biochemistry and microbiology*. 2014. V. 50. N 5. P. 433–440. (English translation).

- Dolgikh V.V., Tsarev A.A., Senderskiy I.V., S. A. Timofeev S.A., Konarev A.V. Production of single chain fragment variable (scFv) antibody against Sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. proteinases hydrolyzing wheat gluten. *Vestnik zashchity rastenii*, Saint Petersburg, 2017. N 1. (This Issue).
- Gavriliuk I.P., Konarev V.G., Shapiro I.D., Vilkoval N.A., Semenova A.Ya., Litvinov A.M. A method of determining damage of wheat grain and flour by pests. *Bull. otkrytii, izobretenii, prom. obraztsov i tovarnykh znakov*. 1975. N 38. RU Patent N 487627. (In Russian).
- Kapustkina A.V., Nefedova L.I. Germination and morphogenesis of wheat seeds damaged by *Eurygaster integriceps*. *Vestnik zashchity rasternii*, Saint Petersburg, 2013. N2. P. 48–55. (In Russian).
- Konarev A.V., Fomicheva Y.V. Cross analysis of the interaction of alpha-amylase and proteinase components of insects with protein inhibitors from wheat endosperm. *Biokhimiya* (Moscow). 1991. V. 56. N 4. P. 628–638. (English translation).
- Konarev A.V., Konarev A.V., Nefedova L.I., Gubareva N.K., Ozay D.S. Analysis of gluten-hydrolyzing proteinase polymorphism in wheat grains damaged by Sunn Pest *Eurygaster integriceps* Put. and related bugs. *Russian Agricultural Sciences*. 2013. V. 39. N. 5–6. C. 390–395. (English translation).
- Konarev A.V., Dolgikh V.V., Senderskiy I.V., Nefedova L.I., Konarev A.V., Gubareva N.K. Properties of natural and recombinant Sunn pest (*Eurygaster integriceps*) salivary gland proteinases hydrolyzing wheat gluten. *Vestnik zashchity rasternii*, Saint Petersburg, 2014. N2. P. 3–16. (In Russian).
- Mosolov V.V., Valueva T.A. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008. V. 44. N 3. C. 233–240. (English translation).
- Pavlyushin V.A., Vilkoval N.A., Sukhoruchenko G.I., Nefedova L.I., Kapustkina A.V. Sunn pest and other grain bugs. Saint Petersburg. 2015. 280 p. (In Russian).
- Vilkoval N.A., Ekman-Burinskaya N.V. Some aspects of Sunn pest *Eurygaster integriceps* Put protein nutrition on different by resistance wheat varieties. In: *Trudy VIZR*. Leningrad: 1977. N 52. P. 39–44. (In Russian).
- Yarovaya G.A. Bioregulating functions and pathogenetic role of the proteolysis. *Laboratornaya meditsina*. 2003. N 6. P.48–54. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 12–20

## IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF SUNN PEST *EURYGASTER INTEGRICEPS* PROTEINASE COMPLEX HYDROLYZING WHEAT GLUTEN PROTEINS

Al.V. Konarev<sup>1</sup>, V.V. Dolgikh<sup>1</sup>, I.V. Senderskiy<sup>1</sup>, A.V. Konarev<sup>2</sup>, A.V. Kapustkina<sup>1</sup>, L.I. Nefedova<sup>1</sup>, N.K. Gubareva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

Sunn pest and other wheat bugs' salivary gland proteinases capable to hydrolyze main wheat gluten proteins (glutenins and gliadins) are responsible for deterioration of quality of flour made of damaged grains. Proteinase activity restriction may be one of the ways to reduce the damage caused by pests, necessitating the study of those enzymes. Using methods of isoelectric focusing, electrophoresis and immunoblotting in conjunction with substrate replica methods, the complexity of the set of participating in Sunn pest extra- and intractintestinal digestion proteinases was estimated, and a number of features of their functioning were revealed. The presence of wheat grain storage protein hydrolyzing proteinase GHP3 in secretory granules of salivary gland cells in form of the inactive zymogen was shown with the help of immunochemical methods. The treatment of bug salivary gland proteins with trypsin leads to the cleavage of propeptides and appearance of active forms of GHP3 and other proteinases. Data obtained allowed to suppose the presence in salivary glands and gut of specific trypsin-like proteinases performing activation of zymogens, when the bugs feed grain. The possibilities of the research data use for the solving plant protection tasks are discussed.

**Keywords:** Sunn pest; salivary gland; damaged grain; proteinase; GHP3; gluten; substrate replica; antibody; recombinant proteinase.

### Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

\* Конярев Александр Васильевич. доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, e-mail: alv-konarev@yandex.ru

Долгих Вячеслав Васильевич. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: dol1slav@yahoo.com

Сендерский Игорь Вадимович. Младший научный сотрудник, e-mail: senderskiy@mail.ru

Капусткина Александра Валерьевна. Научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: ydati@mail.ru

Нефедова Людмила Ивановна. Ведущий научный сотрудник, кандидат сельскохозяйственных наук, e-mail: li-nefedova@yandex.ru

Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44, Российская Федерация

Конярев Алексей Васильевич. Зав. отд. биохимии и молекулярной биологии, доктор биол. наук, профессор, e-mail: a.konarev@vir.nw.ru

Губарева Наталья Константиновна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: nk-gubareva@yandex.ru

### Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

\* Konarev Alexander Vasilievich. Leading Researcher, DSc in Biology, e-mail: alv-konarev@yandex.ru

Dolgikh Vyacheslav Vasilievich. Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: dol1slav@yahoo.com

Senderskiy Igor Vadimovich. Researcher, e-mail: senderskiy@mail.ru

Kapustkina Aleksandra Valerievna. Senior Researcher, PhD in Biology, e-mail: ydati@mail.ru

Nefedova Lyudmila Ivanovna. Leading Researcher, PhD in Agriculture, e-mail: li-nefedova@yandex.ru

N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42-44, B.Morskaya Street, 90000, St. Petersburg, Russia

Konarev Alexey Vasilievich. Head of Biochemistry and molecular biology department, DSc in biology, Professor, e-mail: a.konarev@vir.nw.ru

Gubareva Natalia Konstantinovna. Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: nk-gubareva@yandex.ru

\* Ответственный за переписку

\* Responsible for correspondence