

УДК 632.754:633.11:577.151:577.27

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ АНТИТЕЛА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ГЛЮТЕНИН-ГИДРОЛИЗУЮЩИХ ПРОТЕИНАЗ КЛОПА ВРЕДНАЯ ЧЕРЕПАШКА (*EURYGASTER INTEGRICEPS* PUT.)

В.В. Долгих, А.А. Царев, И.В. Сендерский, С.А. Тимофеев, А.В. Конарев

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Хлебные клопы рода *Eurygaster* Lap. наносят огромный ущерб качеству зерна пшеницы в России и за ее пределами. Протеиназы слюнных желез таких клопов как вредная черепашка, гидролизующие основные белки клейковины пшеницы – глиадины и глютенены, являются важными факторами вредоносности. В предыдущих исследованиях мы осуществили гетерологичную экспрессию глютенин-гидролизующей протеиназы GHP3 клопа вредная черепашка *E. integriceps* в бактериях *E. coli*. В данном исследовании была сконструирована библиотека одноцепочечных антител на основе переменных фрагментов иммуноглобулинов мышей, иммунизированных выделенной рекомбинантной протеиназой. Использование технологии фагового дисплея позволило отобрать из полученной библиотеки рекомбинантное мини-антитело, распознающее GHP3 в пробах белков слюнных желез клопа. Иммуноблоттинг с использованием полученного scFv-фрагмента подтвердил факт присутствия незначительных количеств зрелой формы фермента в поврежденном зерне. Рассматриваются перспективы использования одноцепочечных рекомбинантных антител для дальнейшего изучения протеиназы вредной черепашки, а также для создания ингибиторов глютенин-гидролизующей активности фермента.

Ключевые слова: вредная черепашка, слюнная железа, поврежденное зерно, клейковина, глютенин, протеиназа, одноцепочечные антитела, фаговый дисплей, ингибиторы, иммунодиагностика.

Хлебные клопы рода *Eurygaster* Lap. наносят большой ущерб качеству зерна пшеницы в России, Европе и на Ближнем Востоке [Critchley, 1998; Алехин, 2002; Sivri et al., 2002; Vaccino et al., 2006; Павлюшин и др., 2010]. Одним из самых опасных вредителей пшеницы является клоп вредная черепашка *Eurygaster integriceps* Put. При питании насекомое вводит в эндосперм зерна секрет слюнных желез, содержащий протеиназы и другие пищеварительные ферменты, а затем всасывает частично гидролизованные продукты. При этом ферменты, оставшиеся в зерне в следовых количествах, не только негативно влияют на всхожесть семян [Капусткина, Нефедова, 2013], но и нарушают процесс формирования клейковины при замесе теста [Nariri et al., 2000; Гапонов и др., 2009; Каменченко и др., 2010; Torbica et al., 2014]. Основной мишенью протеиназ хлебных клопов являются главные белки клейковины – глиадины и глютенены.

Среди возможных экологически безопасных подходов к снижению потерь, вызываемых хлебными клопами, можно выделить использование устойчивых сортов [Вилкова, Конарев, 2010; Крупнов, 2011]. Такая устойчивость может быть основана на особенностях структуры запасных белков зерна [Fatehi et al., 2008; Werteker, Kramreither, 2008] или на внедрении в растение генов белковых ингибиторов протеиназ и других гидролаз [Dunaevsky et al., 2005; Gatehouse, 2011; Jamal et al., 2012]. Поиск и конструирование новых специфичных ингибиторов гидролаз хлебных клопов весьма актуальны, поскольку ферменты их слюнных желез малочувствительны к известным растительным ингибиторам [Konarev et al., 2011]. В медицине конструирование специфичного ингибитора может быть успешно осуществлено, если взять за основу одну из известных форм. Например, циклический ингибитор трипсина из подсолнечника SFTI-1 [Luckett et al., 1999; Konarev et al., 2000] можно химически модифицировать и сделать специфичный ингибитор к протеиназам, активность которых возрастает при различных патологиях [Avrutina et al., 2012; Zoller et al., 2012]. Другой способ создания специ-

фичных ингибиторов – использование антител, специфичных к активному центру фермента [Ganesan et al., 2010].

Для использования в области защиты растений большой интерес представляют рекомбинантные одноцепочечные антитела (scFv-фрагменты), представляющие собой два переменных фрагмента легкой и тяжелой цепи иммуноглобулинов, соединенные между собой с помощью гибкого линкера. В отличие от иммуноглобулина, scFv-фрагмент представляет собой единую полипептидную цепь и его ген может быть встроен в геном растения для блокирования активности чужеродных ферментов. Наряду с созданием устойчивых сортов растений, рекомбинантные одноцепочечные антитела к гидролазам хлебных клопов могут быть использованы и для разработки систем иммунодиагностики поврежденного зерна. К преимуществам использования scFv-молекул относятся их низкая себестоимость наработки в бактериях и возможность внесения самых разнообразных модификаций в последовательность белка для придания новых свойств [Albrecht et al., 2006].

В данном исследовании планировалось сконструировать библиотеку одноцепочечных антител (scFv-фрагментов) на основе переменных фрагментов иммуноглобулинов мышей, иммунизированных рекомбинантной формой глютенин-гидролизующей протеиназы rGHP3e клопа вредная черепашка *E. integriceps*, экспрессированной в бактериях *E. coli* [Долгих и др., 2014]. Далее, с использованием технологии фагового дисплея мы попытались отобрать из полученной библиотеки рекомбинантное мини-антитело, специфичное против глютенин-гидролизующей протеиназы GHP3, и оценить возможность и перспективы использования одноцепочечных рекомбинантных антител для дальнейшего изучения протеиназы вредной черепашки, а также для создания ингибиторов глютенин-гидролизующей активности фермента.

Методика исследований

Создание библиотеки рекомбинантных антител к протеиназе rGHP3e. Гетерологичную экспрессию протеиназы GHP3 в бактериях *E. coli*, выделение и солубилизацию рекомбинантной

протеиназы проводили по ранее описанной методике [Долгих и др., 2014]. Мышей иммунизировали рекомбинантным белком в ходе 4 внутрибрюшинных инъекций с 10 дневным интервалом, используя полный адъювант Фрейнда при первой инъекции и неполный при последующих. Общую РНК селезенки иммунизированных животных выделяли с использованием реагента Trizol (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2.5 мкг РНК, 10 mM Трис-Cl (pH 8.8), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM каждого дНТФ, 1 мкг олиго-дТ в качестве затравки, 200 ед. RevertAidTM-MuLV-обратной транскриптазы (Thermo Fisher Scientific) и 5 ед. ингибитора РНКазы в течение часа при 37 °С. После этого смесь прогревали 5 мин при 95 °С и использовали 1.6 мкл смеси для постановки ПЦР. 20 мкл смеси для проведения ПЦР помимо кДНК содержала 67 mM Трис-Cl (pH 8.6), 2.5 mM MgCl₂, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM каждого дНТФ, 10 пмоль праймеров и 2.5 ед. *Taq* ДНК полимеразы (Силекс). Для амплификации всего разнообразия последовательностей переменных фрагментов тяжелых (VH) и легких (VL) цепей IgG мыши были использованы 22 сочетания специально подобранных праймеров (Progen). Матрицу денатурировали 3 мин при 94 °С и ДНК амплифицировали в течение 30 циклов каждый из которых включал денатурацию (94 °С, 30 сек), отжиг (55 °С, 30 сек) и синтез (72 °С, 30 сек). ПЦР-продукты размером около 400 пн выделяли из агарозного геля и использовали в качестве матрицы для проведения второго раунда ПЦР с праймерами, содержащими на 5'-конце сайты рестриктаз для встраивания в вектор pSEX81 (Progen). ПЦР-продукты, кодирующие VH-фрагменты, после электрофореза выделяли из агарозного геля, объединяли и встраивали в вектор по сайтам рестриктаз *NcoI* и *HindIII*. Клетки *E. coli* (штамм XL1-Blue MRF[']) трансформировали полученными конструкциями с помощью электропорации, высевали на твердую среду SOB, содержащую ампицилин (100 мкг/мл), 0.1 M глюкозу (SOB-ГА) и растили в течение суток при 30 °С. Бактериальные клетки соскребали стеклянным шпателем с чашек и хранили при -80 °С в среде 2xYT с ампицилином (100 мкг/мл) и 0.1 M глюкозой (2xYT-ГА) в присутствии 25% глицерина. Плазмидная ДНК из приблизительно полумиллиона бактериальных колоний была выделена с помощью метода щелочного лизиса и использована для встраивания последовательностей, кодирующих VL-фрагменты легких цепей иммуноглобулинов по сайтам рестрикции *MluI* / *NotI*. Электропорация клеток XL1-Blue MRF['] конструкциями после лигирования позволила получить библиотеку, высеванную на 20 чашек с твердой средой SOB-ГА и также состоящую приблизительно из 500 тысяч колоний-трансформантов. Бактериальные клетки соскребали с чашек стеклянным шпателем и полученную библиотеку хранили при -80 °С в 2xYT-ГА в присутствии 25% глицерина.

Отбор рекомбинантных scFv-фрагментов к rGNP3e. Полученную библиотеку в виде 50 мл бактериальной суспензии в среде 2xYT-ГА с плотностью 0.025 оптических единиц при длине волны 600 нм (OD₆₀₀ 0.025) дорастивали при 37 °С до OD₆₀₀ 0.1 и заражали хелперным гиперфагом M13 K07ΔpIII (Progen), добавляя приблизительно 100 фаговых частиц на каждую бактериальную клетку. После инкубации 20 мин при 37 °С без перемешивания и 50 мин при перемешивании на орбитальном шейкере (260 об/мин), среду заменяли на 2xYT с ампицилином (100 мкг/мл) и канамицином (50 мкг/мл). Бактериальную культуру инкубировали на орбитальном шейкере в течение ночи при 37 °С, клетки осаждали центрифугированием и к супернатанту добавляли 1/5 объема 20% ПЭГ6000 (Serva), содержащего 2.5 M NaCl. После инкубации суспензии на льду в течение часа фаговые частицы осаждали центрифугированием при 14000 g и температуре 4 °С в течение 20 мин, ресуспендировали в 4.5 мл буфера для разведения фаговых частиц (10 mM Трис-Cl (pH 7.5), 20 mM NaCl, 2 mM ЭДТА) и хранили при -80 °С. Для отбора вирусных частиц, несущих антитела к rGNP3e, 0.75 мл (1/6 часть) полученной суспензии фагов разводили 1:5 в Трис-солевом буферном растворе

(ТСБ, 50 mM Трис-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl), содержащем 1% БСА, инкубировали 15 мин при комнатной температуре и переносили в пробирки с рекомбинантным белком, иммобилизованным на полосках нитроцеллюлозы. Для иммобилизации антигена рекомбинантный белок rGNP3e, наработанный в бактериях *E. coli*, разделяли с помощью электрофореза в присутствии додецилсульфата Na (ДСН-ПААГЭ) в 12% геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали с помощью красителя Понсо. Мажорную полосу, соответствующую рекомбинантному белку, вырезали, фрагментировали, отмывали буфером ТСБТ (ТСБ, 0.1% Твин-20) и блокировали 2 часа в том же буфере в присутствии 1% БСА. Далее полоски инкубировали в присутствии суспензии фаговых частиц, переворачивая в течение ночи при 4 °С.

После тщательной отмывки ТСБТ, а затем ТСБ связавшихся фагов элюировали в течение 5 мин в 0.75 мл 0.1 M триэтиламина и элюант быстро нейтрализовали добавлением равного объема 1M Трис-Cl (pH 7.5). Полученную суспензию фагов добавляли к 20 мл культуры клеток *E. coli* XL1-Blue MRF['], дороженных в 2xYT при 37 °С до OD₆₀₀ 0.4. После инкубации 20 мин при 37 °С без перемешивания и 50 мин при перемешивании на орбитальном шейкере (260 об/мин) инфицированных фагом бактерий высевали на 5 чашек с твердой селективной средой SOB-ГА и колонии трансформантов выращивали при 30 °С. Общее количество колоний, полученных после первого раунда селекции, составило приблизительно 60 тысяч.

Повторное заражение бактериальной суспензии хелперным фагом, наработка и ПЭГ-преципитация фаговых частиц, несущих рекомбинантные антитела, инкубация суспензии в присутствии иммобилизованного антигена и последующая элюция вирусов позволили заразить ими клетки *E. coli* и осуществить таким образом второй, а затем и третий раунд отбора. После третьего раунда селекции было осуществлено выделение плазмидной ДНК и переклонирование последовательностей, кодирующих рекомбинантные антитела в экспрессирующий вектор pOPE101 (Progen) по сайтам рестрикции *NcoI* / *NotI*.

Гетерологичная экспрессия scFv-фрагментов в бактериях *E. coli*. Полученные конструкции были использованы для трансформации бактерий XL1-Blue MRF['] методом электропорации. Выросшие на чашках с селективной средой SOB-ГА при 30 °С колонии-трансформанты переносили в виде реплик на нитроцеллюлозную мембрану и помещали на ту же среду, но без глюкозы и с добавлением 0.4 mM ИПТГ – специфичного индуктора промотора, контролирующего экспрессию антител. После инкубации колоний на чашках 4 часа при 30 °С мембрану кипятили 5 мин в 0.5% ДСН и использовали для Вестерн-блот анализа с антителами к полигистидиновой последовательности (Sigma-Aldrich), входящей в состав рекомбинантных антител. Отдельные колонии, показавшие высокий уровень экспрессии антител, переносили в лунки иммунологических планшетов, дорастивали в жидкой среде 2xYT-ГА до OD₆₀₀ 0.4, осаждали клетки центрифугированием и ресуспендировали в той же среде с добавлением 0.04 mM ИПТГ, но без глюкозы. После экспрессии рекомбинантных антител в течение 4 часов при комнатной температуре к суспензии добавляли 1 mM ФМСФ, 1 mM ЭДТА-Na₂, 1 мкг/мл пепстатина А (указаны конечные концентрации), бактерий разрушали ультразвуком, дебрис осаждали центрифугированием планшетов при 2500 об/мин 30 мин и супернатант использовали для тестирования антиген-связывающей активности антител. В каждую лунку помещалась полоска нитроцеллюлозы с иммобилизованной рекомбинантной протеиназой. Поскольку при иммуноблоттинге использовались антитела к полигистидиновой последовательности, входящей в состав рекомбинантного антитела, для тестирования антител рекомбинантную протеиназу экспрессировали в векторе pRSETa, в котором полигистидиновая последовательность была заменена на последовательность FLAG (DYKDDDDK). Данная плазмида была любезно предоставлена сотрудником ВНИИХМ Долгих Е.А. В качестве

контрольного белка на нитроцеллюлозную мембрану наносили рекомбинантный экстраклеточный домен рецептора HER2 человека, экспрессированный в *E. coli* в составе того же вектора.

Наработку антител в большем объеме бактериальной культуры (50 мл) осуществляли по методике, использованной для анализа колоний в иммунологических планшетах. Клетки осаждали центрифугированием и разрушали ультразвуком на льду в 5 мл ТСБ с добавлением ФМСФ, пепстатина А и ЭДТА. После разрушения гомогенат центрифугировали 15 мин на холоду при 14 000 г и супернатант в небольших аликвотах хранили при -80°C .

ДСН-ПААГЭ и иммуноблоттинг. Отпрепарированные слюнные железы вредной черепашки *E. intrgriceps* выделяли из взрослых клопов, собранных в Краснодарском крае в 2013 и 2015 гг., гомогенизировали в микроцентрифужных пробирках с помощью пластикового пестика в присутствии ТСБ с добавлением ФМСФ, пепстатина А и ЭДТА. Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 14000 г и супернатант использовали для приготовления проб.

Образцы зерна пшеницы, поврежденного вредной черепашкой, были получены из Саратовской области (сорт Джангаль, 2009 г.) и Турции (сорт Ege-88, 2004 г.). Неповрежденные зерна использовали в качестве контроля. Для приготовления проб белков поврежденного и контрольного зерна пшеницы приблизительно 150 мг муки каждого из вариантов ресуспендировали в 1 мл того же раствора, инкубировали в течение часа при 37°C , периодически перемешивая, и после осаждения нерастворимого материала центрифугированием при 14000 г 15 мин супернатант использовали для приготовления проб.

Полученные супернатанты смешивали с равным объемом 125 мМ Трис-Cl буфера содержащего 4% ДСН, 10% 2-меркаптоэтанол, 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) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану того же производителя с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot® согласно

Результаты исследований

Переклонирование последовательностей, отобранных в результате трех раундов селекции, в экспрессирующий вектор позволило наработать рекомбинантные антитела в бактериях в растворимой форме и показать, что часть полученных трансформантов продуцируют антитела, распознающие протеиназу гНПЗе в ходе иммуноблоттинга. Из 96 проанализированных колоний приблизительно 10% трансформантов продуцировали антитела, специфично распознающие рекомбинантный белок, иммобилизованный на полосках нитроцеллюлозы. Выделение плазмидной ДНК из пяти положительных колоний-трансформантов, амплификация белок-кодирующих последовательностей с использованием праймеров pSEX Nco for (TGCTGCTGCTGGCAGCTCAG) и pSEX Not rev (TGATATCTTTGGATCCAG) и последующий рестрикционный анализ ПЦР-продуктов с помощью частощепящей рестриктазы *HaeIII* показали, что отобранные положительные трансформанты дают идентичный рисунок рестрикции (рис. 1) и продуцируют один тип антител.

Расшифровка белок-кодирующей последовательности в составе вектора рОРЕ 101 показала, что в состав рекомбинантного антитела входят VH и VL-фрагменты, состоящие, соответственно, из 130 и 116 аминокислотных остатков (рис. 2). BLAST-анализ аминокислотной последовательности VH выявил 84–85% идентичности с некоторыми вариантами переменных фрагментов иммуноглобулинов мыши (BAC54674.1, BAC54572.1), пред-

инструкции. Мембраны блокировали час в присутствии ТСБТ, 1% БСА, инкубировали ночь при 4°C с разбавленными тем же раствором 1:50 рекомбинантными антителами, выделенными из бактерий, и отмывали ТСБТ. Далее мембраны последовательно инкубировали 2 часа при комнатной температуре с моноклональными антителами к полигистидиновой последовательности (Sigma-Aldrich), разбавленными ТСБТ 1:2000, а затем с поликлональными антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad), с промежуточной отмывкой ТСБТ. Обработку мембран поликлональными антителами к гНПЗе осуществляли по методике, описанной ранее [Dolgikh et al., 2011]. После отмывки в ТСБТ, а затем ТСБ мембраны инкубировали в свежеприготовленном растворе для проявления пероксидазной реакции содержащем ТСБ, 15% метанол, 0.05% 4-хлоро-1-нафтол (Sigma-Aldrich), 0.02% H_2O_2 .

Анализ последовательности, кодирующей отобранное антитело. Плазмидную ДНК выделяли из выращенных в 2хУТ-ГА бактерий и последовательность в составе вектора рОРЕ, кодирующую отобранное рекомбинантное антитело, секвенировали с использованием праймеров AAGAGGAGAAATTAACCATGA (прямой) и TCATTAGCACAGGCCTCTAGA (обратный).

Иммобилизация scFv-антител на Ni-содержащей смоле и попытка выделения протеиназы из гомогената слюнных желез вредной верепашки. Рекомбинантные антитела, выделенные из 50 мл бактериальной культуры в 5 мл ТСБ с добавлением ФМСФ, пепстатина А и ЭДТА, инкубировали в течение ночи с 0.1 мл смолы HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) при 4°C . После этого смолу отмывали ТСБ и продолжали инкубацию при тех же условиях с 3 мл растворимой фракции белков слюнных желез клопа вредная черепашка, приготовленную также как и при приготовлении проб для ДСН-ПААГЭ. После тщательной отмывки ТСБ связавшиеся белки элюировали в присутствии 0.3 М имидазола или 0.1 М триэтиламина с последующей нейтрализацией равным объемом 1 М Трис-Cl буфера (pH 7.4). Пробы анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного или поликлональных антител.

ставленных на сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Последовательность VL показала 97–96% идентичности с некоторыми вариантами переменных фрагментов каппа легких цепей иммуноглобулинов мыши (AAG12167.1, AAL24040.1). Наиболее близкое из представленных на сайте NCBI рекомбинантное антитело (CAB60133.1) имеет 74.4 и 95.4% идентичности, соответственно, для VH и VL-фрагментов. Таким образом, в результате выполненных исследований нами получено новое рекомбинантное антитело, не имеющее полной гомологии с какими-либо известными последовательностями.

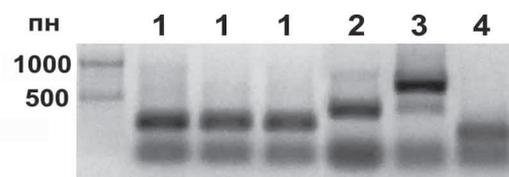


Рисунок 1. Анализ последовательностей ДНК, кодирующих scFv-фрагменты, с использованием частощепящей рестриктазы *HaeIII*. Плазмидную ДНК из различных колоний использовали для амплификации белок-кодирующих последовательностей с последующим рестрикционным анализом ПЦР-продуктов. Все трансформанты, продуцирующие специфичные к протеиназе антитела, показали идентичный рисунок рестрикции (обозначенные цифрой 1 дорожки). Дорожки 2–4 – другие варианты антител.

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAQVQLQQPGAEIVRPGSSVKLSCKTSGYFTTSYWLHWVKRRPGQGLEWIGNINPS
TGGTNSNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNDGYPPYAMDYWGQGTSVTVSSAKTTPPKL
EEGEFSEARVDILMTQSQKFMSTSVGDRVSVTKASQNVGTNAVWYQQKPGQSPQALIYSASYRYSGVPDRFTGS
GGSDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTGGGKLEIKRADAAPTVAAGSEQKLISEEDLSHHHHHHH

Рисунок 2. Аминокислотная последовательность рекомбинантного scFv-фрагмента, специфичного к глютеин-гидролизующей протеиназе вредной черепашки, в составе вектора pOPE101. Вариабельные фрагменты тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулинов подчеркнуты, N-концевая сигнальная последовательность PeIb, ответственная за транспорт гетерологичного белка в периплазматическое пространство бактерий *E. coli*, и полигистидиновая последовательность выделены курсивом.

Иммуноблоттинг показал, что отобранное рекомбинантное антитело распознает глютеин-гидролизующую протеиназу, накапливающуюся в слюнных железах вредной черепашки в виде предшественника (рис. 3, А, дорожка 1, верхняя мажорная полоса), а также его зрелую форму с удаленным пропептидом (рис. 3, А, дорожка 1, нижняя полоса). Идентичная картина наблюдалась и при анализе этой пробы с помощью полученных ранее поликлональных антител (иммунной сыворотки) к рекомбинантному белку rGHP3e (рис. 3, Б, дорожка 1). Отобранный scFv-фрагмент также подтвердил накопление зрелой формы протеиназы в пробах поврежденной клопом (рис. 3, А, дорожка 2), но не контрольной (рис. 3, А, дорожка 3) муки. Проведенный эксперимент ясно показал, что изучаемая протеиназа действительно выделяется вредной черепашкой в поврежденное зерно. Два типа независимо полученных антител распознают при иммуноблоттинге белков поврежденного зерна одну и ту же полосу, соответствующую по своему размеру зрелой форме протеиназы, присутствующей в слюнных железах клопа.

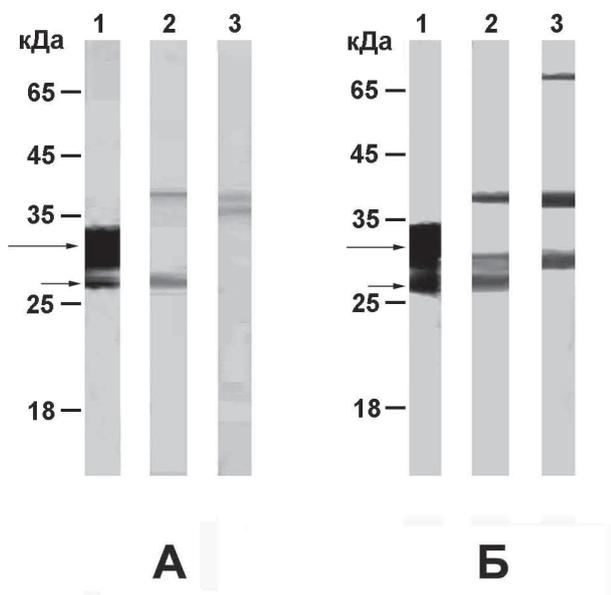


Рисунок 3. Иммуноблоттинг белков слюнных желез вредной черепашки (дорожки 1), поврежденной клопом (дорожки 2) и контрольной (дорожки 3) муки пшеницы с помощью отобранного scFv-фрагмента (А) и иммунной сыворотки к белку rGHP3e (Б). Длинная и короткая стрелки указывают на белковые полосы, соответствующие предшественнику и зрелой форме протеиназы.

На следующем этапе исследования представляло интерес выяснить, узнает ли полученный scFv-фрагмент протеиназу клопа в нативной конформации. При создании библиотеки (иммунизации мышей) и отборе фаговых ча-

стиц нами была использована денатурированная форма rGHP3e, полученная в ходе солюбилизации нерастворимых включений, часто образующихся при экспрессии гетерологичных белков в бактериях [de Groot et al. 2008]. Таким образом, распознаваемый рекомбинантным антителом эпитоп мог быть пространственно скрыт при нахождении протеиназы в нативной конформации.

Наличие полигистидиновой последовательности в С-концевой области рекомбинантной молекулы позволило успешно иммобилизовать наработанный в *E. coli* scFv-фрагмент на Ni-содержащей агарозной смоле His-Select Nickel Affinity Gel. Инкубация частиц агарозы с растворимой фракцией гомогената слюнных желез вредной черепашки и с растворимыми белками поврежденной клопами муки, отмывка смолы и элюция комплекса антиген-антитело в присутствии 0.3 М имидазола не привели к выделению нативного фермента. Во фракциях после элюции с помощью иммуноблоттинга было обнаружено лишь рекомбинантное антитело размером около 34 кДа (рис. 4, указано стрелкой).

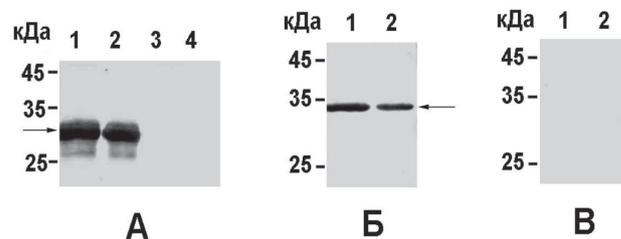


Рисунок 4. Инкубация белков слюнных желез *E. integriceps* и поврежденной вредной черепашкой муки с иммобилизованным на Ni-содержащей смоле scFv-фрагментом не привела к связыванию нативного фермента.

А. Растворимые белки слюнных желез (дорожка 1) инкубировали с иммобилизованным антителом и после промывки частиц агарозы от несвязавшегося материала (дорожка 2) элюцию комплекса антиген-антитело осуществляли в присутствии 0.3 М имидазола в виде двух фракций (дорожки 3 и 4). Перенесенные на нитроцеллюлозу белки анализировали с использованием иммунной сыворотки к rGHP3e. Стрелкой отмечена протеиназа, выявляемая во фракции белков слюнных желез.

Б, В. Растворимые белки поврежденной клопом муки инкубировали с иммобилизованным антителом и после промывки смолы от несвязавшегося материала элюцию осуществляли или в присутствии 0.3 М имидазола (дорожки 1) или в присутствии 0.1 М триэтиламина (дорожки 2).

Перенесенные на нитроцеллюлозу белки анализировали с использованием scFv-фрагмента и антител к полигистидиновой последовательности (Б) или с помощью иммунной сыворотки к rGHP3e (В). Стрелкой на изображении Б отмечен элюированный со смолы scFv-фрагмент, распознаваемый антителами к полигистидиновой последовательности.

Заключение

В данной работе мы получили рекомбинантное одноцепочечное антитело к обладающей глютеинин-гидролизующей активностью трипсин-подобной протеиназе клопа вредная черепашка и смогли доказать, что фермент действительно выделяется вредителем в эндосперм пшеницы, длительное время сохраняясь в поврежденном зерне в зрелой форме. Кроме того, мы получили данные о том, что отобранный scFv-фрагмент распознает протеиназу черепашки лишь в денатурированной форме и может быть использован для обнаружения фермента при иммуноблоттинге в сочетании с ДСН-ПААГЭ. Для дальнейшего изучения этого фермента, чрезвычайно важного как с практической, так и с научной точек зрения, необходимы новые

эксперименты, связанные с гетерологичной экспрессией протеиназы в нативной конформации. Ранее мы показали, что гетерологичная экспрессия фермента в дрожжевых грибах *Pichia pastoris* позволяет получить протеиназу в растворимой, нативной конформации, обладающую глютеинин-гидролизующей активностью [Долгих и др., 2014; Конарев и др., 2014]. В дальнейших экспериментах мы планируем использовать наработанный в *P. pastoris* фермент для получения новой высокопредставительной библиотеки рекомбинантных антител и приступить к поиску scFv-фрагментов, распознающих протеиназу в нативной конформации и способных ингибировать его глютеинин-гидролизующую активность.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, проект № 15-08-04247).

Библиографический список (References)

- Алехин В.Т. Вредная черепашка // Защита и карантин растений. 2002. N 4. С. 65(1)-91(27).
- Вилкова Н. А., Конарев А. В. Современные проблемы иммунитета растений к вредителям // Вестник защиты растений. 2010. N 3. С. 3–15.
- Гапонов С. Н., Васильчук Н. С., Шутарева Г. И. Влияние вредной черепашки (*Eurygaster integriceps* Put.) на качество зерна твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) // Аграрный вестник Юго-Востока. 2009. N 2. С. 23–26.
- Долгих В. В., Сендерский И. В., Конарев А. В. Получение и свойства рекомбинантных протеиназ *Eurygaster integriceps* Put., гидролизующих глютеинин // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. N 4. P. 1–9.
- Каменченко С.Е., Лебедев В.Б., Наумова Т.В. Вредоносность клопа вредная черепашка (*Eurygaster integriceps*) и качество зерна // Аграрный вестник Юго-Востока, 2010. N 1. С. 36–37.
- Капусткина А.В., Нефедова Л.И. Прорастание и морфогенез семян пшеницы при повреждении вредной черепашкой // Вестник защиты растений. 2013. N 2. С. 48–55.
- Конарев Ал.В., Долгих, В.В. Сендерский И.В., Нефедова Л.И., Конарев А.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.
- Крупнов В. А. Селекция пшеницы на устойчивость к вредным клопам (*Eurygaster* spp.): нет ли риска? // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 15. N 3. С. 572–578.
- 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.
- Albrecht H., DeNardo G.L., DeNardo S.J. Monospecific bivalent scFv-SH: Effects of linker length and location of an engineered cysteine on production, antigen binding activity and free SH accessibility // J. Immunol. Methods. 2006. V. 310. N 1–2. P. 100–116.
- Avrutina O., Fittler H., Glotzbach B., Kolmar H., Empting M. Between two worlds: a comparative study on in vitro and in silico inhibition of trypsin and matriptase by redoxstable SFTI-1 variants at near physiological pH // Organic and Biomolecular Chemistry. 2012. V. 10. N 38. P. 7753–7762.
- Critchley B.R. Literature review of sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera, Scutelleridae) // Crop Protection. 1998. V. 17. N 4. P. 271–287.
- de Groot N.S., Espargaró A., More M., Ventura S. Studies on bacterial inclusion bodies // Future Microbiol. 2008. V. 3. N 4. P. 423–435.
- Dolgikh V.V., Senderskiy I.V., Pavlova O.A., Naumov A.M., Beznoussenko G.V. Immunolocalization of an alternative respiratory chain in *Antonospora* (*Paranosema*) locustae spores: mitochondria retain their role in microsporidial energy metabolism // Eukaryotic cell. 2011. V. 10. N 4. P. 588–593.
- Dunaevsky Ya.E., Elpidina E.N., Vinokurov K.S., Belozersky M.A. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects // Molecular Biology. 2005. V. 39. N 4. P. 60–8613.
- Fatehi F., Behamta M. R., Zali A.A. Evaluating the resistance to sunn pest (*Eurygaster integriceps* Put.) and its relationship with high-molecular-weight glutenin subunit in wheat. Proc. 11th Int. Wheat Genet. Symp., Brisbane, Australia, Sydney University Press, 2008, 3, p. 741–743.
- Ganesan R., Eigenbrot C., Kirchhofer D. Structural and mechanistic insight into how antibodies inhibit serine proteases // Biochem. J. 2010. V. 430. N 2. P.179–189.
- Gatehouse J.A. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects // Current Protein and Peptide Science. 2011. V. 12. N 5. P. 409–416.
- Hariri G., Williams P.C., Jaby E.L., Hamein F. Influence of Pentatomidae insects on the physical dough properties and two layered flat-bread baking quality of Syrian wheat // J. Cereal Sci. 2000. V. 31. P. 111–118.
- 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.
- Konarev A.V., Anisimova I.N., GavriloVA V.A., Rozhkova V.T., Fido R., Tatham A.S., P. R. Shewry // Novel proteinase inhibitors in seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.): polymorphism, inheritance and properties // Theoretical and Applied Genetics. 2000. V. 100. N 1. P. 82–88.
- 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.
- Luckett S., Garcia R.S., Barker J.J., Konarev A.V., Shewry P.R., Clarke A.R., Brady R.L. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds // Journal of molecular biology. 1999. V. 290. N. 2. P. 525–533.
- Sivri D., Sapirstein H. D., Bushuk W., Köksel H. Wheat intercultivar differences in susceptibility of glutenin protein to effects of bug (*Eurygaster integriceps*) protease // Cereal Chem. 2002. V. 79. N. 1. P. 41–44.
- Torbica A.M., Mastilović J. S., Pojić M.M., Kevrešan Ž.S. Effects of wheat bug (*Eurygaster* spp. and *Aelia* spp.) infestation in preharvest period on wheat technological quality and gluten composition // The Scientific World Journal. 2014. Article ID 148025 (<http://dx.doi.org/10.1155/2014/148025>). (Accessed 15.12.2016)
- Vaccino P., Corbellini M., Reffo G., Zoccatelli G., Migliardi M., Tavella L. Impact of *Eurygaster maura* (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on quality of bread wheat in relation to attack period // Journal of Economic Entomology. 2006. V. 99. N 3. P. 757–763.
- Werteker M., Kramreither G. Relation between susceptibility to wheat bug attack and digestibility of glutenin // Journal of Cereal Science. 2008. V. 47. N 2. P. 226–232.
- Zoller F., Markert A., Askoxylakis V., Altmann A., Barthe P., Weichert W., Zhao W., Mier W., Haberkorn U. Combination of phage display and molecular grafting generates highly specific tumor-targeting miniproteins // Angewandte Chemie – Int. Edition. 2012. V. 51. N 52. P. 13136–13139.

Translation of Russian References

- Alekhin V.T. Sunn pest. Zashchita i karantin rastenii. 2002. N 4. P. 65(1)–91(27). (In Russian).
- Dolgikh V.V., Senderskiy 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).
- Gaponov S.N., Vasilchuk N.S., Shutareva G.I. Sunn pest (*Eurygaster integriceps* Put.) influence on Durum wheat (*Triticum durum* Desf.) grain quality. Agrarnyi vestnik Yugo-Vostoka. 2009. N 2. P. 23–26. (In Russian).
- Kamenchenko S.E., Lebedev V.B., Naumova T.V. Harmfulness of corn bug (*Eurygaster integriceps*) and grain quality. Agrarnyi vestnik Yugo-Vostoka. 2010. N 1. P. 36–37. (In Russian).
- Kapustkina A.V., Nefedova L.I. Germination and morphogenesis of wheat seeds damaged by *Eurygaster integriceps*. Vestnik zashchity rasternii, Saint Petersburg, 2013. N 2. P. 48–55. (In Russian).
- Konarev A.I.V., Dolgikh V.V., Senderskii 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).
- Krupnov V.A. Wheat Breeding for resistance to harmful bugs (*Eurygaster spp.*): Are there risks? Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii. 2011. V. 15. N 3. P. 572–578.
- 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).
- Vilkova N.A., Konarev A.V. Modern problems of immunity of plants to pests. Vestnik zashchity rasternii, Saint Petersburg, 2010. N 3. P. 3–15. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 21–26

RECOMBINANT SINGLE CHAIN ANTIBODIES AS IMPLEMENT FOR DETECTION AND STUDYING *EURYGASTER INTEGRICEPS* PROTEINASES HYDROLYZING GLUTEN

V.V. Dolgikh, A.A. Tsarev, I.V. Senderskiy, S.A. Timofeev, A.V. Konarev

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

Wheat bugs of genus *Eurygaster* Lap. cause great damage to the quality of wheat in Russia and abroad. Proteases of the salivary glands of such bug as sunn pest *Eurygaster integriceps*, hydrolyzing the basic proteins of wheat gluten (gliadins and glutelins), are important factors of harmfulness. In previous studies, we over-expressed *E. integriceps* gluten-hydrolyzing proteinase GHP3 in bacteria *E. coli*. Here we have constructed the library of single chain antibodies (scFv-fragments) on the basis of variable fragments of immunoglobulins of mice immunized with recombinant proteinase. Phage display technology has enabled us to select the mini-antibody specifically recognizing GHP3 in samples of bug salivary glands. Immunoblotting using scFv-fragment has also confirmed the presence of minor amounts of the enzyme in damaged grain. The prospects of use of single-chain recombinant antibodies for further study of bug proteinases, as well as for construction of inhibitors of their glutenin-hydrolyzing activity are discussed.

Keywords: Sunn pest; *Eurygaster integriceps*; salivary gland; damaged grain; gluten; glutenin; proteinase; single chain antibody; phage display; inhibitor; immunodiagnosics.

Сведения об авторах

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

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

Царев Александр Александрович. Студент СПбГУ, e-mail: alexandretsarev@gmail.com

Сендерский Игорь Вадимович. Младший научный сотрудник, e-mail: sen54@mail.ru

Тимофеев Сергей Александрович. Ведущий инженер, e-mail: ts-bio@yandex.ru

Конарев Александр Васильевич. Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, e-mail: al_konarev@hotmail.com

Information about the authors

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

*Dolgikh Viacheslav Vassiljevich. Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: dol1slav@yahoo.com

Tsarev Alexandr Alexandrovic. Student, Saint-Petersburg State University, e-mail: alexandretsarev@gmail.com

Senderskiy Igor Vadimovich. Researcher, e-mail: sen54@mail.ru

Timofeev Sergey Alexandrovich. Leading Engineer, e-mail: ts-bio@yandex.ru

Konarev Alexander Vasilievich. Leading Researcher, DSc in Biology, e-mail: al_konarev@hotmail.com

* Ответственный за переписку

* Responsible for correspondence