

# ПРИРОДНЫЕ И РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ ВРЕДНОЙ ЧЕРЕПАШКИ *EURYGASTER INTEGRICEPS* PUT, ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ БЕЛКИ КЛЕЙКОВИНЫ ПШЕНИЦЫ

**Конарев А.В., Долгих В.В., Сендерский И.В., Нефедова Л.И., Капусткина А.В.**

ФГБНУ «Всероссийский НИИ защиты растений», Санкт-Петербург, [al\\_konarev@hotmail.com](mailto:al_konarev@hotmail.com)

Протеиназы слюнных желез клопа вредная черепашка, гидролизующие клейковину пшеницы и ухудшающие качество муки, представляют интерес как важные факторы вредоносности, как потенциальные «мишени» для защитных белков-ингибиторов, как маркеры для диагностики повреждения зерна, а также как модификаторы клейковины для промышленности и медицины. Несмотря на обилие данных, полученных разными исследователями, пока отсутствует целостное представление о многообразии и свойствах протеолитических ферментов клопа и поврежденного им зерна. Для разработки подходов к снижению ущерба от действия ферментов вредителя необходимо выявление и изучение как их природных, так и рекомбинантных форм, а также разработка адекватных методов их анализа. С помощью методов изофокусирования, электрофореза и хроматографии в сочетании с новыми вариантами методов субстратных реплик в поврежденных зернах были выявлены протеолитические ферменты нескольких типов: нейтральные протеиназы (НП) с ИЭТ в интервале рН от 6.5 до 7.5, способные гидролизовать компоненты клейковины - глютен и глиадин, но не белок животного происхождения – желатин; щелочные протеиназы (ЩП) с ИЭТ в интервале от 7.5 до 9, гидролизующие белки клейковины и желатин; протеолитические ферменты (вероятно, пептидазы) гидролизующие низкомолекулярные пептидные хромогенные субстраты с остатком аргинина в позиции P1 (Z-Val-Lyz-Lys-Arg-TFMCA и др.) с ИЭТ выше 7.0; БАПНазы, гидролизующие VAPNa с ИЭТ в кислой и щелочной зонах рН, а также факторы (Ф), вызывающие снижение столба клейковины при анализе методом седиментации с ДСН-Na. Указанные ферменты отсутствовали в неповрежденных зернах. По данным анализа отдельных поврежденных зерен из различных образцов, НП, ЩП, пептидазы и Ф обладали молекулярной массой близкой к 30 кДа, но характеризовались независимой изменчивостью по компонентному составу или наличию/отсутствию (Ф коррелировал как с НП, так и ЩП). Активность всех компонентов НП и отдельных ЩП, а также Ф подавлялась PMSF, что указывает на их принадлежность к сериновым ферментам. В слюнных железах были выявлены НП, близкие по ИЭТ и субстратной специфичности НП из зерна, а также пролил-специфичный фермент, гидролизующий субстрат ZGPPNA с ИЭТ в кислой зоне рН. Ранее одна из форм НП была выделена из зерна, и на основании данных об ее аминокислотной последовательности с использованием мРНК слюнных желез был клонирован ряд последовательностей, кодирующих протеиназы (Konarev et al., 2011). Форма GHP3 была экспрессирована в клетках микроорганизмов и обладала способностью гидролизовать глютен (Долгих и др., 2014; Конарев и др., 2014). С помощью антител к рекомбинантному белку было выявлено его накопление в слюнных железах в форме неактивного зимогена. Обработка трипсином активировала фермент, что позволило предположить существование аналогичного механизма *in vivo* в ходе питания клопа на зерне. Рекомбинантные протеиназы вредной черепашки и антитела к ним будут использованы при конструировании специфичных белковых ингибиторов данных ферментов, которые могут найти применение при создании форм пшеницы, устойчивых к хлебным клопам.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 15-08-04247а).