

Владимир ЦОЙ,

младший научный сотрудник Центра передовых технологий
при Министерстве Высшего образования, науки и инноваций
E-mail: vladimirs9003@gmail.com
Тел: 97 700 16 38

Дильбар ДАЛИМОВА,

доктор биологических наук, заместитель директора Центра передовых технологий при Министерстве Высшего образования, науки и инноваций

Шахноза ИБРАГИМОВА,

младший научный сотрудник лаборатории Биотехнологии Центра передовых технологий при Министерстве Высшего образования, науки и инноваций

Музаффар МУМИНОВ,

младший научный сотрудник лаборатории Биотехнологии Центра передовых технологий при Министерстве Высшего образования, науки и инноваций

Дарья ЗАКИРОВА,

младший научный сотрудник лаборатории Биотехнологии Центра передовых технологий при Министерстве Высшего образования, науки и инноваций

Шахло ТУРДИКУЛОВА,

доктор биологических наук, директор Центра передовых технологий при Министерстве Высшего образования, науки и инноваций

На основе рецензии заведующего лабораторией геномики института биофизики и биохимии, к.б.н. Абдурахимова Аброржона.

ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ТИПА РАСТИТЕЛЬНОГО ДЕФЕНЗИНА С АНТИМИКРОБНЫМ И ФУНГИЦИДНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Аннотация

Растения имеют белки и пептиды, которые разрушают микроорганизмы путем воздействия на их мембраны. Эти соединения эффективнее антибиотиков и могут использоваться для создания устойчивых к патогенам трансгенных организмов. Однако поиск и выделение антимикробных пептидов из природных объектов — сложный и длительный процесс. В результате проделанной нами работой была изучена активность пептидов растительного происхождения, сконструирована рекомбинантная ДНК с геном дефензина Ns-D2 и подтверждена антимикробная и фунгицидная активность рекомбинантного дефензина. Таким образом предложена альтернативная и более доступная система его получения.

Ключевые слова: дефензины, *Nigella sativa*, Ns-D2, рекомбинантная ДНК, вектор.

ANTIMIKROB VA FUNGITSID TA'SIRIGA EGA BO'LGAN O'SIMLIK DEFENSINING REKOMBINANT TURINI OLISH

Annatsiya

O'simliklar tarkibida mikroorganizmlar membranasiga ta'sir etib, ularni parchalaydigan oqsil va peptidlar mavjud. Ushbu birikmalar antibiotiklarga qaraganda samaraliroq va patogenlarga chidamli transgen organizmlarni yaratish uchun qo'llanilishi mumkin. Biroq, mikroblarga qarshi peptidlarni tabiiy ob'ektlardan izlash va ajratib olish murakkab va uzoq vaqt talab etadigan jarayondir. Bizning tadqiqotlarimiz natijasida o'simlikdan olingan peptidlarning faolligi o'rganildi, Ns-D2 defensin geni bilan rekombinant DNK tuzildi va rekombinant defensinning antimikrob va fungitsid faolligi tasdiqlandi. Shunday qilib, defenzin olish uchun muqobil va qulayroq usul taklif qilindi.

Kalit so'zlar: defensinlar, *Nigella sativa*, rekombinant DNK, vektor.

OBTAINING A RECOMBINANT TYPE OF PLANT DEFENSIN WITH ANTIMICROBIAL AND FUNGICIDAL ACTIVITY

Annotation

Plants have proteins and peptides that destroy microorganisms by affecting their membranes. These compounds are more effective than antibiotics and can be used to create pathogen-resistant transgenic organisms. However, the search and isolation of antimicrobial peptides from natural objects is a complex and lengthy process. As a result of our work, the activity of plant-derived peptides was studied, recombinant DNA with the Ns-D2 defensin gene was constructed, and the antimicrobial and fungicidal activity of recombinant defensin was confirmed. Thus, an alternative and more accessible system for obtaining it is proposed.

Key words: defensins, *Nigella sativa*, Ns-D2, recombinant DNA, vector.

Введение. Растения содержат белки и пептиды, которые защищают их от патогенов. Эти соединения разные по структуре и действию, но общее у них то, что они разрушают мембраны микроорганизмов. Они лучше антибиотиков, потому что микробы не могут к ним приспособиться. Изучение этих соединений поможет создать трансгенные растения и животных, устойчивых к болезням. Известно, что растения защищаются от микробов с помощью PR-белков, которые делятся на 14 классов по структуре и активности [1]. Они разрушают мембраны и клеточные стенки патогенов, ингибируют их ферменты и реагируют на элиситоры. Выделение антимикробных пептидов из природных объектов - сложная и долгая задача, необходимо искать новые более доступные антимикробные пептиды [2,3].

Литературный обзор. Семена седаны *Nigella sativa* издавна применяются народами Центральной Азии и Китая в качестве специй и лекарств. Исследования показали, что масло и его активные вещества имеют высокую антимикробную и противоопухолевую активности. Одним из таких веществ являются дефензины, извлеченные из семян седаны. Известно, что растительные дефензины имеют противогрибковую и антибактериальную активность, ингибируют протеиназы и амилазы насекомых. Они играют важную роль в защитной системе растений, образуя антимикробные защитные слои между разными видами тканей и органов растений, а также вокруг семян [4,5]. На сегодняшний день антимикробные пептиды-дефензины изучаются как потенциальные соединения, применение которых возможно в медицине и сельском хозяйстве [6]. Два новых дефензина, названных Ns-D1 и D2-Ns, были извлечены и определена их первичная аминокислотная последовательность. Пептиды различаются между собой одним аминокислотным остатком, и показали высокое сходство с последовательностью с *Raphanus Sativus L.* дефензинами RS-AFP1 и RS-AFP2. NS-D1 и D2-Ns дефензины характеризуются сильной и разнообразной противогрибковой активностью к ряду фитопатогенных грибов. Устойчивые к патогенам дефензины из *Nigella sativa* имеющие высокую фунгицидную активность являются перспективными кандидатами в получении генно-инженерных растений [7].

Материалы и методы. Дизайн синтетического гена проводилась в программе GeneOptimizer. Далее дизайнировались и синтезировались олигонуклеотиды, осуществлялась сборка гена. Сборка гена проходила при помощи OE-PCR. Синтезированный ген клонировали в экспрессионную плазмиду pRSET_A. Для проверки правильности сборки гена и плазмид проводился сиквенс получившейся конструкции. После получения компетентных клеток *E.coli* проводилась трансформация гена в клонирующие клетки *E.coli* TOP10, выделялась плазмидная ДНК и трансформировалась в экспрессирующие клетки *E.coli* C43. Индукцию экспрессии белка проводили при помощи IPTG. Разрушение индуцированных клеток проводилось с помощью ультразвука. Также был проведен гель-электрофорез PAGE в 15% геле и анализ Вестерн Блот с антителами к His-Tag. Очистку проводили при помощи металл-афинной хроматографии. Активность полученного пептида проверяли при помощи метода пятен на агаре против контрольных культур.

Результаты и их обсуждение. С помощью программы GeneOptimizer подобрали соответствующую кодирующую последовательность, оптимизированную для экспрессии в *E.coli*. Также нуклеотидную последовательность гена Ns-D2 разбили на олигонуклеотиды длиной 40-60 н.п. (также с помощью программы DNAworks) для последующей сборки гена методом OE-PCR. Затем синтетический ген дефензина Ns-D2 был лигирован в плазмиду pMK-T и векторная конструкция была трансформирована в клетки *E.coli* для клонирования – TOP10 (Invitrogen). В результате этого получили колонии, которые в следствии культивировались. Далее выделяли ДНК и переносили в экспрессирующую плазмиду pRSET_A по сайтам рестрикции HindIII / NdeI.

Для клонирования гена Дефензина Ns-D2 амплифицированный ген обрабатывали эндонуклеазами рестрикции HindIII / NdeI для получения липких концов. Для клонирования был выбран вектор pRSET_A, предназначенный для экспрессии рекомбинантных белков в *E. coli* и содержащий ген резистентности к ампициллину. Выделенные по описанной выше методике продукты гидролиза рестриктазами векторной ДНК и ампликона гена Дефензина лигировали ДНК-лигазой фага T4. В результате нами была получена векторная конструкция, содержащая вставку копии гена дефензина pRSET_A - Ns-D2. Далее положительные рекомбинантные молекулы вектора были секвенированы и показали наличие вставки, соответствие клонированной последовательности с запатентованной последовательностью гена.

Методом трансформации тепловым шоком, плазмидная ДНК pRSET_A с клонированным геном Дефензина, была трансформирована в клетки штамма C43(DE3) *E. coli*, содержащие в своем геноме ген, кодирующий полимеразу фага T7 под контролем индуцибельного бактериального промотора. Выбор данных штаммов обусловлен тем, что они содержат лизоген DE3, несущий ген, кодирующий полимеразу фага T7 под контролем индуцибельного промотора lacUV5, необходимую для экспрессии гена, клонированного в плазмиде pRSET_A. Стоит также отметить, что штамм несет мутированный ген *gpe*, кодирующий усеченный вариант РНК-азы, что должно приводить к увеличению стабильности м-РНК в клетке вследствие уменьшения ее ферментативной деградации [10,11].

В результате были получены штаммы *E. coli* C43[DE3] pRSET_A –Defensin. Для обнаружения рекомбинантного пептида был проведен PAGE-гель электрофорез в 15% геле и Вестерн Блот анализ, которые показали наличие рекомбинантного дефензина в лизате клеток штамма C-43, после трансформации, отбора и индукции экспрессии белка.

В результате проделанной работы получен искусственный ген Дефензина, клонированный в вектор pRSET_A под сайты рестрикции HindIII и NdeI. Также с N-концевой части пептида добавлена гистициновая метка и сайт разрезания Энтерокиназой для упрощения стадий очистки протеина. Полученная векторная конструкция была клонирована в клетках *E.coli* штаммах TOP-10. Проведен контрольный рестрикционный анализ полученной векторной конструкции. Рекомбинантная ДНК проэкспрессирована в клетках штамма C-43, полученные лизаты проанализированы методом PAGE гель электрофореза и Вестерн Блот анализа, пептид обнаружен в виде мономерных и вероятно ди- и тетрамерных структур.

Далее определяли оптимальные концентрации клеток экспрессирующего штамма *E.coli* C-43 путем подбора оптической плотности культивирования бактериальных клеток в диапазоне от 0,4 до 1,2 при длине волны 600 нм добавляя индуктор лактозного промотора IPTG до конечной концентрации 1 mM с последующей инкубацией в течение 3 часов.

Для очистки полученной рекомбинантной конструкции был успешно применен метод металл-афинной хроматографии. Использовали коммерческие сефарозные Co²⁺ шарики Talon от компании ClonTech. На последней стадии очистки проводили удаление полигистицинового домена при помощи легкой цепи фермента энтерокиназы EKMax™ в концентрации 1 Unit фермента на 120 мкг белка, реакцию проводили при 37⁰ C в течение 16 часов. Очищенную фракцию подвергали анализу методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установленная чистота очищенного дефензина в 98% была достаточна для разработки лекарственного препарата на основе дефензина. Для проверки антимикробной активности пептида был использован модифицированный метод пятен на двухслойном агаре. В качестве тест культур были использованы *S.aureus*, *C.albicans*. Исследуемые концентрации дефензина составили

от 7,5 до 26 мкг/мл. Стоит отметить, что для *C.albicans* минимальная концентрация рекомбинантного дефензина при которой наблюдается бактериостатический эффект равен 9 мкг/мл, а для *S.aureus* 7,5 мкг/мл.

Заключение и рекомендации. В результате выполненной работы была изучена активность пептидов растительного происхождения против микроорганизмов, сконструирована и выражена рекомбинантная ДНК с геном дефензина Ns-D2, оптимизированы условия очистки и удаления метки рекомбинантного дефензина, подтверждена антимикробная и фунгицидная активность рекомбинантного дефензина. В качестве рекомендаций была предложена альтернатива традиционным антибиотикам на основе пептидов.

ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finkina EI, Melnikova DN, Bogdanov IV, Ovchinnikova TV. Plant Pathogenesis-Related Proteins PR-10 and PR-14 as Components of Innate Immunity System and Ubiquitous Allergens. *Curr Med Chem*. 2017;24:1772–87.
2. Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters*. 1990;69:55–9.
3. Mee Do H, Chul Lee S, Won Jung H, Hoon Sohn K, Kook Hwang B. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Science*. 2004;166:1297–305.
4. Huang HW. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*. 2000;39:8347–52.
5. Mosolov VV, Valueva TA. [Proteinase inhibitors and their function in plants: a review]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2005;41:261–82.
6. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:710–20.
7. Hannan MA, Rahman MA, Sohag AAM, Uddin MJ, Dash R, Sikder MH, et al. Black Cumin (*Nigella sativa* L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. *Nutrients*. 2021;13:1784.
8. Rogozhin EA, Oshchepkova YI, Odintsova TI, Khadeeva NV, Veshkurova ON, Egorov TA, et al. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. *Plant Physiol Biochem*. 2011;49:131–7.
9. Rodrigues da Cunha L, Fortes Ferreira CLL, Durmaz E, Goh YJ, Sanozky-Dawes R, Klaenhammer T. Characterization of *Lactobacillus gasseri* isolates from a breast-fed infant. *Gut Microbes*. 2012;3:15–24.
10. Bulet P, Stöcklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett*. 2005;12:3–11.
11. Chen G-H, Hsu M-P, Tan C-H, Sung H-Y, Kuo CG, Fan M-J, et al. Cloning and characterization of a plant defensin VaD1 from azuki bean. *J Agric Food Chem*. 2005;53:982–8.