

ISSN 2224-5308

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

# Х А Б А Р Л А Р Ы

---

---

## ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES  
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА  
СЕРИЯСЫ**



**СЕРИЯ  
БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ**



**SERIES  
OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

**4 (316)**

**ШІЛДЕ – ТАМЫЗ 2016 ж.**

**ИЮЛЬ – АВГУСТ 2016 г.**

**JULY – AUGUST 2016**

1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН  
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА  
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963

ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ  
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД  
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR

АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА  
АЛМАТЫ, НАН РК  
ALMATY, NAS RK

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі

**Ж. А. Арзықұлов**

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Айтхожина Н.А.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Байгулин И.О.** (бас редактордың орынбасары); биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Берсімбаев Р.И.**; биол. ғ. докторы, ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Бишімбаева Н.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Күзденбаева Р.С.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Рахышев А.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ақшолақов С.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Алшынбаев М.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Березин В.Э.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Бисенбаев А.Қ.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ботабекова Т.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Жамбакин К.Ж.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Қайдарова Д.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Локшин В.Н.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Огарь Н.П.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Рахыпбеков Т.К.**

Р е д а к ц и я к ең е с і:

**Абжанов Архат** (Бостон, АҚШ); **Абелев С.К.** (Мәскеу, Ресей); **Лось Д.А.** (Мәскеу, Ресей); **Бруно Луненфелд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); философия докторы, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Ұлыбритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Ұлыбритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, АҚШ); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, ҚХР)

Главный редактор

академик НАН РК

**Ж. А. Арзыкулов**

Редакционная коллегия:

доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.А. Айтхожина**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **И.О. Байтулин** (заместитель главного редактора); доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Р.И. Берсимбаев**; доктор биол. наук, чл.-корр. НАН РК **Н.К. Бишимбаева**; доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **Р.С. Кузденбаева**, доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **А.Р. Рахисhev**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **С.К. Акшулаков**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.К. Алчинбаев**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Э. Березин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Бисенбаев А.К.**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Ботабекова**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **К.Ж. Жамбакин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Д.Р. Кайдарова**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Н. Локшин**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Н.П. Огарь**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Рахыпбеков**

Редакционный совет:

**Абжанов Архат** (Бостон, США); **С.К. Абелев** (Москва, Россия); **Д.А. Лось** (Москва, Россия); **Бруно Луненфельд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); доктор философии, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Великобритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Великобритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, США); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, КНР)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская». ISSN 2224-5308

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,  
[www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz](http://www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz)

---

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2016

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

**Zh.A. Arzykulov**,  
academician of NAS RK

Editorial board:

**N.A. Aitkhozhina**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **I.O. Baitulin**, dr. biol. sc., corr. member of NAS RK (deputy editor); **R.I. Bersimbayev**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **N.K. Bishimbayeva**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **R.S. Kuzdenbayeva**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **A.R. Rakhishev**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **S.K. Akshulakov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **M.K. Alchinbayev**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.E. Berezin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **A.K. Bisenbayev**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Botabekova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **K.Zh. Zhambakin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **D.R. Kaidarova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.N. Lokshin**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **N.P. Ogar**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Rakhypbekov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK

Editorial staff:

**Abzhanov Arkhat** (Boston, USA); **S.K. Abelev** (Moscow, Russia); **D.A. Los** (Moscow, Russia); **Bruno Lunenfeld** (Israel); **Harun Parlar**, dr., prof. (Munich, Germany); **Stefano Perni**, dr. phylos., prof. (Cardiff, UK); **Saparbayev Murat** (Paris, France); **Saul Purton** (London, UK); **Sarbassov Dos** (Houston, USA); **Gao Endzhun**, dr., prof. (Shenyang, China)

**News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.**  
**ISSN 2224-5308**

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,  
<http://nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz>

---

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2016

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 4, Number 316 (2016), 92 – 97

**CLONING AND ANALYSIS OF BASIC CLASS I CHITINASE  
AND  $\beta$ -1,3-GLUCANASE GENES FROM POTATO INDUCED  
BY *FUSARIUM SOLANI* INFECTION**

**A. P. Chirkin, R. E. Zhidkeeva, G. A. Ismagulova**

M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, CS MES RK.

E-mail: chirkin\_a@mail.ru

**Key words:** chitinase gene of 1 class, gene  $\beta$ -1,3-glucanase, cloning, potatoes.

**Abstract.** One of the main components of plant's immune system is PR (pathogenesis-related) proteins. Among those there are enzymes which hydrolyze the fungal cell wall, namely chitinase and glucanase. Full-size genes of basic class I chitinase and 1,3- $\beta$ -glucanase were isolated and cloned from *Solanum tuberosum* cv. Aksor for creation of expression units to be used in cisgenic plants transformation. Analysis of the structure of the cloned chitinase gene showed a synonymous change of adenine by guanine and insertion of ATG in the beginning of the coding sequence of mRNA. Expression vector constructs were created on the basis of *pBI121* vector and the above mentioned genes.

УДК 577.113

**КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ГЕНОВ ОСНОВНОЙ ХИТИНАЗЫ  
1-ГО КЛАССА И  $\beta$ -1,3-ГЛЮКАНАЗЫ КАРТОФЕЛЯ,  
ИНДУЦИРОВАННЫХ НА ЗАРАЖЕНИЕ *FUSARIUM SOLANI***

**А. П. Чиркин, Р. Е. Жидкеева, Г. А. Исмагулова**

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина», КН МОН РК,

Алматы, Казахстан

**Ключевые слова:** гены хитиназы 1 класса, ген  $\beta$ -1,3-глюканазы, клонирование, картофель.

**Аннотация.** Одной из важной составляющей иммунитета растения являются PR-белки (pathogenesis-related). Среди большой группы белков можно выделить ферменты, расщепляющие клеточную стенку грибов, таких как хитиназы и глюканазы. С целью создания экспрессионных конструкций для цис-генной трансформации растений были выделены и клонированы полноразмерные гены основной хитиназы 1-го класса и 1,3- $\beta$ -глюканазы из картофеля *Solanum tuberosum* сорта отечественной селекции «Аксор». В ходе анализа структуры клонированного гена хитиназы было установлено наличие синонимичной замены аденина на гуанин и инсерции ATG в начале кодирующей части мРНК. На основе вектора *pBI121* и полученных генов были созданы экспрессионные векторные конструкции.

**Введение.** Защитный механизм у высокоорганизованных растений сформировался в процессе их развития в ответ на различные биотические и абиотические факторы, включая воздействие патогенов, тяжелых металлов, засухи, низких температур, а также в результате засоления почв [1]. Подобного рода стрессы могут приводить к структурным и биохимическим изменениям в растениях, таких как формирование клеточных структур защитного ответа, синтез фенольных соединений и фитоалексинов [2]. Все это происходит в ответ на сигналы, запускающие определенные

механизмы самозащиты растения. Стратегия устойчивости растений против различных факторов стресса включает в себе активацию разнообразных механизмов, в том числе и синтеза белков с предполагаемой защитной функцией. Группа белков, кодируемых определенными генами, а иногда и группой генов, индуцированная под действием стресса различной природы носит название pathogenesis-related proteins (англ. связанные с патогенезом белки - PR-белки) или белки защитного ответа. В отличие от фитоалексинов, продуцируемых локально здоровыми клетками, имеющими непосредственный контакт с некротическими и поврежденными участками, PR-белки аккумулируются не только в инфицированных и окружающих ее тканях, но и в здоровых и далеко удаленных тканях. Практически каждое растение имеют гены защитного ответа, отличающиеся лишь их активностью, с этой же характеристикой коррелирует устойчивость и восприимчивость растения. Фоновое количество экспрессии генов, кодирующих белки защитного ответа, резко увеличивается за счет этого реализуется иммунный ответ [3].

Растительные хитиназы и 1,3- $\beta$ -глюканазы относятся к семейству генов защитного ответа. Хитин и  $\beta$ -глюкан – основные компоненты клеточных оболочек грибов, из хитина построены скелеты сосущих насекомых и нематод [4-6].

На сегодняшний день в геноме тетраплоидного картофеля *S. tuberosum* выявлено два вида основных хитиназ 1-го класса В и С [7]. Для них характерна высокая гомология нуклеотидной и аминокислотной последовательности от 90 до 80% [8]. Наибольшее различие выявляются в степени гликозилирования фермента и, следовательно, его движения в геле. Наиболее гликозилированными считаются хитиназы группы С. Белки данной группы экспрессируются в клетках постоянно не зависимо от времени и при этом только в листьях. К более иммуноспецифичным можно отнести хитиназы групп А и В, которым характерна индуцибельная экспрессия под действием элиситоров грибного происхождения. К не менее гетерогенному семейству также можно отнести 1,3- $\beta$ -глюканазы. Ферменты этой группы в зависимости от функции, выполняемой в клетке, можно разделить на две группы. Первая – участие в росте и развитии растения и вторая – участие в опосредованной иммунной реакции.

Целью работы являлось получение полноразмерных генов основной хитиназы 1 класса и 1,3- $\beta$ -глюканазы из отечественного сорта картофеля Аксор, а также получение на их основе растительных экспрессионных векторных конструкций для цис-генной трансформации растений.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы сорт картофеля *Solanum tuberosum* Аксор и патотип *Fusarium solani* F RKM-0167, предоставленный РГП "Республиканская коллекция микроорганизмов" (Астана, Казахстан). Растения картофеля, полученные из клубней, выращивали в контролируемых условиях световой комнаты в течение 6 недель. Затем проводили заражение листьев и почвы грубым фильтратом, состоящим из спор и мицелия *F. solani* (0167). Выделение тотальной РНК (тотРНК) из растений осуществляли после 24-х, 48-и и 72-х часов заражения с использованием набора Qiagen (США) по протоколу производителя. кДНК получали реакцией обратной транскрипции ферментом М-Mlv (Thermoscientific) с олигодТ15 праймером по протоколу производителя фермента. Нарработку фрагмента гена хитиназы и эндо-1,3- $\beta$ -глюканазы проводили методом ПЦР с использованием LR- полимераза (Силекс, Россия) в концентрации 5 ед. в реакционной смеси, содержащей 70mM Tris-HCl (pH 9.3), 16,6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, коктейль из dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) по 100мкМ каждого, по 10 pmol каждого из праймеров: СЗВF ATG GAG TTC ACT ATT TTT TCT TTA СТА TTC TC; СЗВF TTA CAC AGT ATC GAC TAA GAG TCC GTT; G3ВF ATG GCT ACC TCA CAA ATA GCT GTT A; G3ВR CGC GAA TGC ATC TAG ATC GT. Условия проведения амплификации: начальная денатурация при 95°C в течение 5 минут, 30 циклов – 95°C – 1 мин, 1 мин – 55° (для хитиназы) или 54° (для эндо- $\beta$ -1,3-глюканазы), 72°C – 2 мин, финальная элонгация при 72°C – 5 мин. Полученные фрагменты были заклонированы в вектор pUC57 по рестрикционным сайтам *Bam*HI и *Sac*I. Определение первичной нуклеотидной последовательности вставки в векторе pUC57 производили на секвенаторе 3500 Series Genetic Analyzer (Lifetechnologies) с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Lifetechnologies) согласно протоколу производителя. После секвенирования гены были переклонированы в

вектор pBI121 с использованием рестриктаз *Bam*HI и *Sac*I. Биоинформационный анализ полученных и предполагаемых результатов, а также выравнивание нуклеотидной и аминокислотных последовательностей проводили при помощи программы VectorNTISuite 10.0 и в предоставляемых Интернет-ресурсами базах данных в режиме он-лайн на сайтах: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> и <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gen-bank>.

### Результаты исследования и их обсуждение

Несмотря на обилие полученных результатов исследований участия хитиназ и  $\beta$ -1,3-глюканаз в физиологических и защитных процессах растений, роль и молекулярные механизмы функционирования этих ферментов в процессах жизнедеятельности растений остаются еще не полностью выясненными. В настоящее время установлен ряд индукторов, которые активируют синтез белков хитиназ и 1,3- $\beta$ -глюканаз [7]. Однако малоизвестно о том, какие дальнейшие изменения в экспрессии растительных генов и, в конечном итоге, метаболизме растительной клетки, происходят при действии этих гидролитических ферментов. Не выявлено, какие сигналы при индуцированной активации растительных хитиназ и 1,3- $\beta$ -глюканаз могут осуществлять взаимосвязь с другими метаболитами растительной клетки. Понимание роли хитиназ и 1,3- $\beta$ -глюканаз в процессах роста и развития растений затруднено еще и по той причине, что в растениях обнаружено несколько изоформ ферментов, которые отличаются клеточной локализацией и индуцибельностью.

Для выделения полноразмерных генов основной хитиназы 1 класса и  $\beta$ -1,3-глюканазы картофеля как потенциальных генов-кандидатов, играющих важную роль в иммунитете растения в ответ на грибные заражения различной природы, был выбран сорт картофеля казахстанской селекции «Аксор». Для выделения искомого гена использовали специфические праймеры, разработанные на основе молекул U02607.1 хитиназы и NM\_001287940 глюканазы, полученных из базы банных GenBank.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей было установлено, что полученные нами гены хитиназы и глюканазы идентичны молекулам из GenBank на 99,5 и 100%, соответственно.

Незначительные различия для клонированной хитиназы из сорта Аксор (*ChitB3\_Aksor*) были выявлены в 6-ом положении (3-е гена U02607.1) за счет замены аденина на гуанин и инсерция триплета ATG на 5'конце молекулы. Эта замена оказалась синонимичной и не привела к смене аминокислоты в последовательности белка. В свою очередь инсерция триплета ATG стала причиной появления аминокислоты метионина вначале белковой молекулы. Исходя из вышесказанного, клонированный ген *ChitB3\_Aksor* можно отнести к основным хитиназам 1 класса группы В. Для данной группы хитиназ характерна специфическая, индуцибельная экспрессия под действием грибного заражения и элиситоров грибного происхождения. На рисунке 1 представлены нуклеотидная и аминокислотная последовательности выделенного гена *ChitB3\_Aksor*.

Ген глюканазы, выделенный из сорта Аксор (*GlucB2\_Aksor*), оказался идентичным модельному гену NM\_001287940. Замен в кодирующей части не было выявлено. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности гена *GlucB2\_Aksor* представлены на рисунке 2.

Как было показано в работе L. Veerhues с соавторами, экспрессия генов хитиназы и 1,3- $\beta$ -глюканазы различается в зависимости от органа растения. Значительно высокий уровень активности глюканазы наблюдался в более зрелых, нижних листьях по сравнению с молодыми листьями, в которых активность этого фермента вообще отсутствовала. В то же время мРНК хитиназы присутствовала во всех листьях растения, особенно в молодых. Подобная разница была обнаружена и в стебле. Экспрессия гена хитиназы отмечена во всех частях стебля, в отличие от глюканазы, для которой был выявлен незначительный уровень в нижней, более зрелой части растения. В остальных частях растения экспрессия этих генов был примерно одинаковой. мРНК хитиназы и 1,3- $\beta$ -глюканазы присутствовали в корне и цветке и отсутствовали в клубнях [7].

**Создание экспрессионных конструкций.** Для создания экспрессионных конструкций целевые гены *ChitB3\_Aksor* и *GlucB2\_Aksor* были переклонированы в растительный экспрессионный вектор *pBI121*. Для данного вектора характерно наличие селективного маркерного гена неомизин-фосфотрансферазы II (*NPTII*) устойчивости к канамицину под контролем *nos*-промотора гена

```

M E F T I F S L L F S L L L L N A S A E Q C G S
1 ATGGAGT TCACTAT TTTTCT TACTAT TCTCTCT CCTTTG CTGAACG CCTCGGC GGAGCAA TGTGGTT
  Q A G G A L C A P G L C C S K F G W C G N T N
71 CACAGGC CGGAGGC GCGCTTT GTGCCCC AGGACTC TGTGTGA GCAAATT CGGCTGG TGTGGTA ATACAAA
  D Y C G P G N C Q S Q C P G G P G P S G D L G
141 TGACTAT TGTGGTC CAGGTAA TTGCCAG AGCCAGT GTCCTGG CGGCCCC GGTCTTT CAGGGGA CTTAGGC
  G V I S N S M F D Q M L N H R N D N A C Q G K N
211 GGTGTTA TTTCAA TTCCATG TTTGATC AGATGCT TAATCAT CGCAACG ATAATGC TTGTCAA GGAAAGA
  N F Y S Y N A F I S A A G S F P G F G T T G D
281 ATAATTT STATAGT TACAATG CCTCAT CAGTGTG GCTGGGT CTTTTCC TGGCTTT GGCAC TA GTGGTA
  I T A R K R E I A A F L A Q T S H E T T G G W
351 TATAACT GCCCGTA AAAGGGA AATGCT GCTTTCC TTGCCCA AACTTCC CATGAAA CTACTGG AGGATGG
  P S A P D G P Y A W G Y C F L R E Q G S P G D Y
421 CCTTCAG CACCTGA TGGACCA TACGCAT GGGGTTA CTGCTTC CTTAGAG AACAAAG TAGCCCG GGCGATT
  C T P S S Q W P C A P G R K Y F G R G P I Q I
491 ACTGTAC ACCAAGT AGTCAAT GGCCTTG TGCTGCT GGAAGGA AATATTT CGGACGA GGCCCAA TCCAAAT
  S H N Y N Y G P C G R A I G V D L L N N P D L
561 TTCACAC AACTACA ACTATGG GCCATGT GGAAGAG CCATCGG AGTGGAC CTTTTAA ACAATCC TGATTTA
  V A T D S V I S F K S A I W F W M T P Q S P K P
631 GTAGCCA CAGACTC AGTCATC TCATTTA AATCGG TATCTGG TTCTGGA TGACAC TCAACT CCAAAG
  S C H D V I T G R W Q P S G A D Q A A N R V P
701 CTCTTTG CCACGAT GTCATCA CCGGAAG ATGGCAA CCATCTG GCGCTGA CCAAGCA GCTAATC GTGTCCC
  G F G V I T N I I N G G L E C G H G S D S R V
771 TGGATTG GGTGTCA TCACAAA CATCATC AATGGTG GCTTGGG ATGTGGT CATGGAA GTGACAG GTGAGG
  Q D R I G F Y R R Y C G V L G V S P G D N L D C
841 CAGGACC GAATTGG ATTTTAC AGGAGGT ATTGCGG AGTCTTT GGAGTTA GTCCTGG TGACAA CTTGATT
  G N Q R S F G N G L L V D T V *
911 GTGGCAA CCAGAGG TCTTTG GAAACGG ACTCTTA GTCGATA CTGTGTA A

```

Рисунок 1 – Нуклеотидная и аминокислотная последовательности клонированного гена *ChitB3\_Aksor*

```

M A T S Q I A V I V L L G L L V A T N I H I T E
1 ATGGCTA CCTCACA AATAGCT GTTATCG TGCTTCT AGGATTA CTTGTTG CCACCAA CATTCA ATTACAG
  A Q L G V C Y G M M G N N L P S H S E V I Q L
71 AGGCTCA ATTAGGT GTTTGCT ATGGAAT GATGGGG AACAACT TGCCATC ACATTCC GAAGTTA TACAGCT
  Y K S R N I G R L R L Y D P N Q G A L N A L R
141 CTACAAG TCAAGAA ACATTGG AAGATTG AGGCTTT ATGATCC GAATCAA GGAGCTT TAAATG GTTAA
  G S N I E V I L G L P N V D V K H I A S G M E H
211 GGATCAA ACATTGA AGTGATA CTAGGAC TTCCAAA TGTAGAT GTGAAAC ACATTGC TTCTGGG ATGGAAC
  A R W W V Q K N V K D F W P D V K I K Y I A V
281 ACGCGAG ATGGTGG GTACAGA AGAACGT TAAAGAT TTCTGGC CTGATGT TAAAATT AAGTACA TAGCTGT
  G N E I S P V T G T S S L T S F Q V P A L V N
351 TGSTAAT GAAATCA GCCCTGT TACTGGC ACATCGT CTCTTAC CTCATTT CAAGTTC CTGCTTT GGTTAAC
  I Y K A V G E A G L G N D I K V S T S V D M T L
421 ATTTATA AAGCAGT CGGTGAA GCTGGTT TGGGAAA TGACATT AAGGTTT CAACATC AGTAGAC ATGACGT
  I G N S Y P P S Q G S F R N D V R W F T D P I
491 TGATTGG CAATTCT TATCCAC CATCACA AGGTTCT TTTAGGA ACGATGT TAGATGG TTCACTG ATCCGAT
  V G F L R D T R A P L L V N I Y P Y F S Y S G
561 TGTGGGG TTTTAA GGGATAC ACGTGCA CCTTTGC TCGTTAA CATTAT CTTTATT TTAGCTA TTCTGGT
  N P G Q I S L P Y A L F T A P N V V V Q D G S R
631 AATCCAG GACAGAT TTCACTT CCGTATG CTCTTTT TACAGCA CCTAATG TGTTGGT ACAAGT GGATCAC
  Q Y R N L F D A M L D S V Y A A M E R T G G G
701 GTCAATA TAGGAAC TTATTTG ATGCTAT GTTGGAT TCTGTTT ATGCTGC GATGGAA CGAACAG GAGGAGG
  S V G I V V S E C G W P S A G A F G A T Q D N
771 ATCTGTA GGAATG TTGTGTC AGAGTGT GGATGGC CGTCTGC TGGTGCA TTTGGTG CCACACA AGACAA
  A A T Y L R N L I Q H A K E G S P R K P G P I E
841 GCAGCAA CATACTT GAGGAAC TTAATTC AACATGC GAAAGAA GGTAGTC CGAGAAA GCCTGGA CCTATCG
  T Y I F A M F D E N N K N P E L E K H F G L F
911 AGACTTA TATATTC GCCATGT TTGATGA AAATAAC AAGAATC CAGAGCT TGAGAAA CATTTTG GATTGTT
  S P N K Q P K Y N L N F G V S E R V W D I S A
981 TTCCCA AACAAAG AGCCAAA ATATAAC STAACT TTGGGGT GTCTGAG AGAGTTT GGGACAT TTCTGCT
  E T N S T A S S L I S E M *
1051 GAAACTA ATAGCAC TGCTTCT TCCCTCA TAAGTGA GATGTAA

```

Рисунок 2 – Нуклеотидная и аминокислотная последовательности гена *GlucB2\_Aksor*

нопаин-синтазы агробактерий. Гены интереса в свою очередь находиться под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты. С использованием эндонуклеаз *Bam*HI и *Sac*I гены *ChitB3\_Aksor* и *GlucB2\_Aksor* были вырезаны из бактериального вектора *pUC57* и заклонированы по тем же сайтам рестрикции в вектор *pBI121*. На рисунке 3 представлены результаты рестрикционного анализа векторных конструкций *pUC57ChitB3\_Aksor*, *pUC57GlucB2\_Aksor* и *pBI121*.



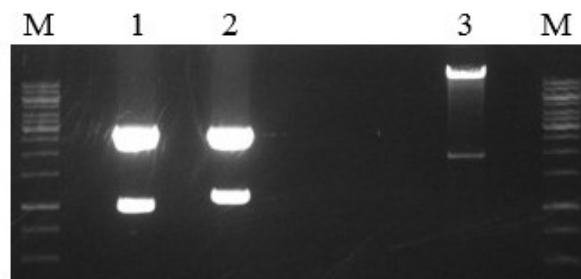


Рисунок 3 – Электрофорез рестриционных фрагментов конструкций *pUC57ChitB3\_Aksor*, *pUC57GlucB2\_Aksor* и *pBI121*. Дорожка М – ДНК маркер GeneRuler 1 kb (Thermofisher), дорожки 1 – рестрикция *pUC57ChitB3\_Aksor* *Bam*HI и *Sac*I; 2 – рестрикция *pUC57GlucB2\_Aksor* *Bam*HI и *Sac*I; 3 – рестрикция *pBI121* *Bam*HI и *Sac*I

В дальнейшем, векторные конструкции *pBI121ChitB3\_Aksor* и *pBI121GlucB2\_Aksor* использовались для получения минимальных единиц экспрессии (МЕЭ). МЕЭ считается последовательность ДНК, в которой присутствует ген интереса и регуляторные последовательности для нормального функционирования этого гена в трансгенном организме. В нашем случае МЕЭ включали ген NPT II, как селективный маркер трансформации, гены основной хитиназы 1 класса и  $\beta$ -1,3-глюканазы, выделенные из сорта Аксор.

На рисунке 4 представлен гель электрофорез рестриционных фрагментов конструкций *pBI121ChitB3\_Aksor* и *pBI121GlucB2\_Aksor*. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что минимальные экспрессионные единицы для генов хитиназы и глюканазы составляли 4720 п.н. и 4852 п.н., соответственно.

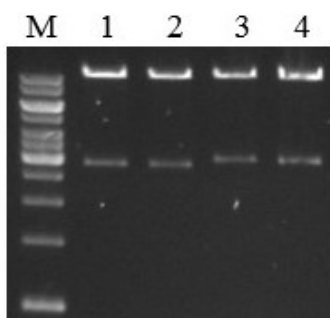


Рисунок 4 – МЕЭ хитиназы и глюканазы для трансформации картофеля. Дорожка М – ДНК маркер GeneRuler 1 kb (Thermofisher), дорожки 1 и 2 – МЕЭ *pBI121ChitB3\_Aksor*; 3 и 4 – МЕЭ *pBI121GlucB2\_Aksor*

В результате проделанных исследований были выделены гены основной хитиназы 1 класса и 1,3- $\beta$ -глюканазы из картофеля сорта Аксор в ответ на заражение фитопатогенном *F. solani*. Анализ нуклеотидных последовательностей показал идентичность клонированных генов молекулам из мировой базы данных GenBank. Ген хитиназы оказался идентичным гену-шаблону на 99,5%, а ген глюканазы – на 100%. Было установлено, что выделенный ген хитиназы относится к основным хитиназам 1-го класса подгруппы В.

В гене хитиназы были выявлены синонимичная замена в 6-ом положении и инсерция триплета *ATG* в начале гена. Замена в 6-ом положении не привела к смене аминокислоты в последовательности белка, а в следствии инсерции триплета *ATG* вначале белковой молекулы появился метионин.

На основе полученных генов и вектора *pBI121* созданы экспрессионные конструкции для цисгенной трансформации растений.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Agrios G. N. Plant Pathology / 4th Edition. – London: Academic Press, 1997. – 34 p.
- [2] Bowles D.J. Defense-related proteins in higher plants // Annu. Rev. Biochem. – 1990. – Vol. 59. – P. 873-907.

- [3] VanLoon L.C., VanKammen A. Polyacrylamide disc electrophoreses of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Smsun" and Samsun NN" II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. – 1970. – Vol. 40. – P. 199-206.
- [4] Boller T. Cellular and Molecular Biology of Plant Stress (Key J. L., and Kosuge T., Eds.). – 1985. – P. 247-262. – A. R. Liss, New York.
- [5] Pan S.Q., Ye X.S., Kuc J. Direct detection of  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels // *Anal. Biochem.* – 1989. – Vol. 18. – P. 136-140.
- [6] Adams D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases // *Microbiology.* – 2004. – Vol. 150. – P. 2029-2035.
- [7] Beerhues L., Kombrink E. Primary structure and expression mRNAs encoding basic chitinase and 1,3- $\beta$ -glucanase in potato // *Plant Molecular Biology.* – 1994. – Vol. 24. – P. 353-397.
- [8] Ancillo G., Witte B., Schmelzer E., Kombrink E. A distinct member of the basic (class I) chitinase gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells // *Plant Molecular Biology.* – 1999. – Vol. 39. – P. 1137-1151.

## REFERENCES

- [1] Agrios G. N. *Plant Pathology*. 4th Edition. London: Academic Press. 1997. 34 p.
- [2] Bowles D.J. Defense-related proteins in higher plants // *Annu. Rev. Biochem.* 1990. Vol. 59. P. 873-907.
- [3] VanLoon L.C., VanKammen A. Polyacrylamide disc electrophoreses of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Smsun" and Samsun NN" II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. 1970. Vol. 40. P. 199-206.
- [4] Boller T. *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress* (Key J. L., and Kosuge T., Eds.). 1985. P. 247-262. A. R. Liss, New York.
- [5] Pan S.Q., Ye X.S., Kuc J. Direct detection of  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels // *Anal. Biochem.* 1989. Vol. 18 P. 136-140.
- [6] Adams D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases // *Microbiology.* 2004. Vol. 150. P. 2029-2035.
- [7] Beerhues L., Kombrink E. Primary structure and expression mRNAs encoding basic chitinase and 1,3- $\beta$ -glucanase in potato // *Plant Molecular Biology.* 1994. Vol. 24. P. 353-397.
- [8] Ancillo G., Witte B., Schmelzer E., Kombrink E. A distinct member of the basic (class I) chitinase gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells // *Plant Molecular Biology.* 1999. Vol. 39. P. 1137-1151.

***FUSARIUM SOLANI*-ДІ ЖҰҚТЫРУҒА ИНДУКЦИЯЛАНҒАН КАРТОПТЫҢ БАСТЫ  
1-ШІ КЛАСТАҒЫ ХИТИНАЗАНЫ ЖӘНЕ 1,3- $\beta$ -ГЛЮКАНАЗАНЫ КЛОНДАУ  
ЖӘНЕ ГЕНДЕРГЕ ТАЛДАУЫН ЖАСАУ**

**А. П. Чиркин, Р. Е. Жидкеева, Г. А. Исмагулова**

ҚР БҒМ ҒК, РМК «М. А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты»,  
Алматы, Қазақстан

**Түйін сөздер:** 1-ші кластағы хитиназа гені,  $\beta$ -1,3-глюканаза гені, клондау, картоп.

**Аннотация.** Өсімдік иммунитетінің ең маңызды құрамдас бөліктерінің бірі PR-ақуыздары болып табылады. Хитиназа және глюканазалар сияқты саңырауқұлақтар жасуша қабырғасын бөлшектейтін ферменттерді ақуыздар арасынан бөліп алуға болады. Өсімдіктерді цис-гендік трансформациялау үшін дәлдік құрылымын құру мақсатында *Solanum tuberosum* отандық сұрыпталған «Аксор» картоп сортынан 1,3- $\beta$ -глюканазалар және 1-ші кластағы басты хитиназалар толық өлшемді гендер клондалды және бөлініп алынды. Талдау барысында клондалған хитиназа генінің құрылымы адениннен гуанинге синонимдік ауысуы және мРНҚ-ның кодтау бөлігі басында ATG енгізу болып табылады. *pV121* векторы негізінде және алынған гендерден экспрессиондық векторлы конструкциялар құрылды.

Поступила 04.05.2016 г.

---

---

## **Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct ([http://publicationethics.org/files/u2/New\\_Code.pdf](http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf)). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

[www.nauka-nanrk.kz](http://www.nauka-nanrk.kz)

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова*  
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 18.07.2016.  
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.  
7,75 п.л. Тираж 300. Заказ 4.