

Клонування та аналіз кДНК дефензину 1 сосни звичайної

В. А. Ковальова, І. Т. Гут¹, Р. Г. Кіямова², В. В. Філоненко², Р. Т. Гут

Національний лісотехнічний університет України
Вул. Генерала Чупринки, 103, Львів, 79057, Україна

¹Лондонський університет
Гавер стр., Лондон, WC1E 6 BT, Велика Британія

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

vakovaleva@mail.ru

Антифунгальний білок з молекулярною масою 5,6 кДа очищено з коренів семиденних проростків сосни звичайної. Мас-спектрометричним аналізом показано його приналежність до рослинних дефензинів. кДНК дефензину 1 сосни (PsDef1) довжиною 252 п. н. отримано методом ПЛР-ампліфікації з кДНК бібліотеки Pinus sylvestris L. та клоновано у вектор pET 23d(+). PsDef1 кДНК кодує білок з 83 амінокислотних залишків (а. з.), який містить N-кінцевий сигнальний пептид з 33 а. з. Зріла форма білка вирізняється наявністю специфічних консервативних залишків, властивих усім рослинним дефензинам. Показано структурну та функціональну подібність між PsDef1 та дефензинами групи I.

Ключові слова: сосна звичайна, дефензин PsDef1, молекулярне клонування.

Вступ. В останнє десятиліття досягнуто значного прогресу у розумінні механізмів реагування рослинних організмів на зміни зовнішнього середовища, зокрема, на дію патогенних організмів.

Ключовим моментом у реалізації імунної відповіді рослин на патогенні чинники є активація транскрипції генів антимікробних білків (АМП), які підвищують стійкість самих рослин до патогенних організмів або пригнічують розвиток останніх [1]. До рослинних АМП належать тіоніни, ліпід-транспортні білки, геветіни, снейкіни, дефензини та ін. АМП – це невеликі (2–9 кДа) секреторні білки з компактною структурою, стабілізованою дисульфідними містками. Кількість та розташування -Cys-Cys-пар є характерною ознакою для кожного класу антимікробних білків. Цим білкам власти-

ва висока активність проти багатьох патогенних бактерій та грибів як *in vitro*, так і в трансгенних рослинах [2, 3].

Особливе місце серед АМП з широким спектром біологічної дії посідають рослинні дефензини – 4–6 кДа білки, третинну структуру яких формують -спіраль, три антипаралельних -шари та чотири внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язки [2, 4]. Захисна функція рослинних дефензинів зумовлена їхньою антифунгальною [5, 6], антибактеріальною [7] та інсектицидною [8] активністю. Варто відмітити, що деякі з цих білків є інгібіторами протеаз [7, 9]. Така значна гетерогенність властивостей дефензинів та особливості амінокислотного складу стали основою для їхньої класифікації у чотири групи [6]. Представники групи I (морфогенної) інгібують ріст широкого кола фітопатогенних грибів і викликають морфологічні зміни міцелію. Антифунгальна активність дефен-

зинів групи II не супроводжується морфологічними змінами грибів. Антибактеріальні властивості у білків цих двох груп або відсутні, або слабо виражені. Рослинні дефензини групи III активні проти бактерій, інгібують α -амілази, протеази *in vitro* та синтез білків у безклітинних системах, але фунгістатичних властивостей не проявляють. Представникам групи IV притаманна як антифунгальна активність без морфогенної дії, так і висока антибактеріальна активність проти грампозитивних і грамотригативних бактеріальних патогенів [10].

Дефензини ідентифіковано в багатьох таксономічних групах рослин. У *Pinophyta* показано експресію чотирьох дефензиноподібних білків: defensin precursor (GbD) *Ginkgo biloba* (родина *Ginkgoaceae*) [11], defensin (PgD1) *Picea glauca* [12], putative plant defensin SPI1 та SPI1B *Picea abies* (родина *Pinaceae*) [13]. На сьогодні рослинні дефензини виділено з насіння, вегетативних та генеративних органів покритонасінних рослин. Нещодавно ми вперше очистили дефензиноподібний білок з представника відділу голонасінних, який за антифунгальними властивостями подібний до АМП [14]. Молекулярне клонування та порівняльний аналіз первинної структури дефензину 1 сосни звичайної (PsDef1) з відомими рослинними дефензинами наведено у цій роботі.

Матеріали і методи. У досліджах використано відсортоване життєздатне насіння *Pinus sylvestris* L., отримане з ДП «Буське ЛГ» Львівської області. кДНК дефензину 1 сосни звичайної клонували з використанням клітин *Escherichia coli* штаму XL-1 Blue та вектора *pET 23d (+)* («Novagen», США).

Дефензин з проростків сосни звичайної очищували, як описано в наших попередніх роботах [14–16]. Чистоту препаратів білка визначали електрофоретично за денатурувальних умов з DS-Na у градієнтному (5–22 %) поліакриламідному гелі (ПААГ) у системі Леммлі [17] або у трис-трициновому буфері з використанням 15 %-го ПААГ з 3 %-м вмістом бісакриламідну [18]. Гелі фарбували азотнокислим сріблом.

Мас-спектрометричний аналіз білків здійснювали у Лондонському університеті. Забарвлені білкові смужки вирізали з гелю, білки після відновлення 10 мМ дитіотреїтолом та алкілування 100 мМ

йодацетамідом гідролізували трипсином. Суміш одержаних протеолітичних пептидів фракціонували на колонці PerMap C18 («LC Packings», Нідерланди) протягом 30 хв у градієнті (5–40 %) густини ацетонітрилу в 0,1 %-й мурашиній кислоті. Аналіз проводили на мас-спектрометрі Q-TOF I («Micromass», Велика Британія). За отриманими результатами проводили пошук у базах даних Swissprot та EST GenBank (EST_Others) за допомогою програми Mascot («Matrixscience», Велика Британія).

Послідовність праймерів для ампліфікації кДНК PsDef1 добирали, використовуючи дані про нуклеотидні послідовності гомологічних EST клонів з бібліотек кДНК *Pinus pinaster* (сосна приморська) та *P. taeda* (сосна ладанна). кДНК PsDef1 одержали в двох окремих ПЛР з використанням як матриці 1 мкл первинної бібліотеки кДНК *P. sylvestris* (1,2 \cdot 10⁶ фагів в 1 мл), створеної нами на основі мРНК із коренів проростків сосни звичайної [19], або ампліфікованої (2 \cdot 10⁹ фагів в 1 мл).

Прямим праймером слугував олігонуклеотид CR 763 (5'-CCATTCCCATGGCGGGCAAGGGA-GT-3'), що містить сайт рестрикції ендонуклеази *NcoI*, ініціювальний метіонін та 5'-кінцеву послідовність відкритої рамки зчитування кДНК клону BX 678613. Зворотний праймер CR 764 (5'-CATGAGAATTCTCTCAAGGGCAGGGTTTGTA-3') включав послідовності для ендонуклеази рестрикції *EcoRI*, стоп-кодону та 3'-кінцевого кодуєчого фрагмента вищезазначеного клону. ПЛР проводили в ампліфікаторі «Proteus» («Helena BioSciences», Велика Британія) з використанням реактивів виробництва «Fermentas» (Литва) у такому режимі: 94 °C, 3 хв та 30 циклів (94 °C, 1 хв; 60 °C, 1 хв; 72 °C, 1 хв) і після останнього циклу – 5 хв при 72 °C.

Продукти ПЛР аналізували в 1,5 %-му агарозному гелі в трис-боратному буфері, рН 8,3 (50 мМ трис-Н₃ВО₃, 2 мМ ЕДТА) за напруги 20 В/см². Специфічний продукт очікуваного розміру елюювали з гелю за допомогою набору для екстракції ДНК («Qiagen», США).

Одержану ДНК та вектор *pET23d(+)* гідролізували рестриктазами *NcoI* і *EcoRI*. Реакцію лігування проводили впродовж 2 год при кімнатній температурі з використанням ДНК-лігази фага T4

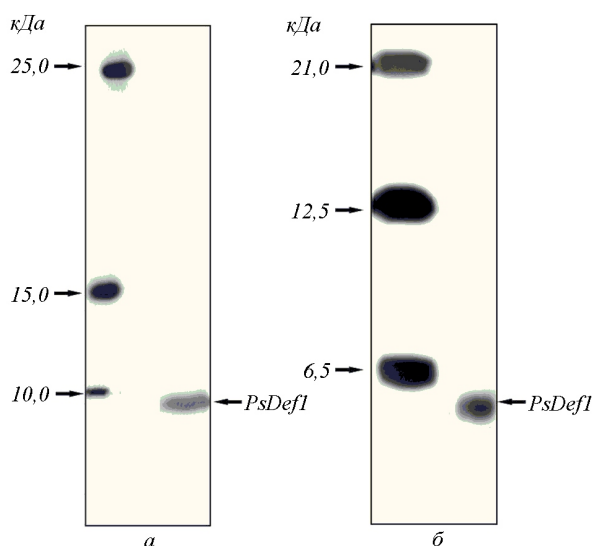


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз антифунгального білка сосни звичайної (PsDef1) за присутності 0,1 % DS-Na: фракціонування в 5–22 %-му ПААГ у системі Леммлі (а); розділення в 15 %-му ПААГ у трис-трициновому буфері (б). Забарвлення 0,1 %-м розчином нітрату срібла

(«Fermentas») згідно з протоколом виробника. Клітини XL-1 Blue трансформували лігазною сумішшю за стандартною методикою [20]. Наявність клонованої ДНК у векторі перевіряли рестрикцією ендонуклеазами *NcoI* та *EcoRI* і ПЛР з праймерами CR 763 та CR 764. Нуклеотидну послідовність клонованого фрагмента визначали за допомогою автоматичного ДНК-секвенатора ABI 73TM («Applied Biosystems», Велика Британія).

Гомологію нуклеотидної та амінокислотної послідовностей ДНК дефензину 1 сосни звичайної аналізували за допомогою електронної пошукової служби BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США.

Результати і обговорення. Нещодавно нами очищено з коренів семиденних проростків сосни звичайної низькомолекулярний білок із сильною інгібіторною дією щодо росту деяких фітопатогенних грибів. Це дало нам можливість зробити припущення про приналежність цього білка до рослинних дефензинів [14]. Електрофоретичним аналізом у 5–22 %-му ПААГ за Леммлі виявлено, що молекулярна маса (м. м.) дефензиноподібного білка сосни звичайної менша за 10 кДа (рис. 1, а). Для точнішого визначення цієї величини електрофоретичним

методом ми використали трис-трицинову буферну систему, яка є оптимальною для розділення низькомолекулярних білків і пептидів. Електрофоретичне розділення препарату PsDef1 у 15 %-му ПААГ за денатурувальних умов показало, що м. м. цього білка складає 5–6 кДа (рис. 1, б), що є характерним для рослинних дефензинів.

Для ідентифікації білка проведено мас-спектрометричний аналіз пептидів, утворених внаслідок протеолізу його трипсином. У результаті ідентифіковано пептид з амінокислотною послідовністю TEGFPTGSCDFHVAGR (рис. 2, а). Пошук гомологічних послідовностей, депонованих у GenBank, за допомогою електронної системи BLASTP (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi) виявив декілька амінокислотних послідовностей з високим рівнем гомології (рис. 2, б), що належать дефензинам голонасінних: 94 % гомології з відповідним пептидом GbD *G. biloba*, 87 % – SPI1 *P. abies* та PgD1 *P. glauca*. Отже, ми отримали підтвердження того, що очищений нами антифунгальний білок з проростків сосни є дефензином.

Оскільки нуклеотидна послідовність, що кодує відомі дефензини *P. abies* та *P. glauca*, складається з 252 п. н., варто було очікувати, що, використавши амінокислотну послідовність ідентифікованого мас-спектрометричним аналізом пептиду для пошуку в базах даних EST клонів кДНК бібліотек роду *Pinus*, нам вдасться знайти клони, які б містили повну нуклеотидну послідовність дефензину. За допомогою програми TBLASTN ми виявили 10 таких клонів у кДНК бібліотеках *P. pinaster* і 23 клони – у *P. taeda*. Потрібно зазначити, що гомологія кодуєчої дефензин ділянки між цими видами сосни склала 95 %, повністю ідентичними були кінцеві фрагменти, що було враховано при конструюванні праймерів для клонування кДНК дефензину 1 сосни звичайної.

Для молекулярного клонування дефензину 1 *P. sylvestris* використано бібліотеку кДНК, створену нами на основі мРНК, виділеної з коренів семиденних проростків сосни [19]. Первинна і ампліфікована бібліотеки слугували матрицями в ПЛР за присутності праймерів, специфічних до дефензину 1 сосни звичайної. Електрофоретичним аналізом продуктів ПЛР визначено наявність

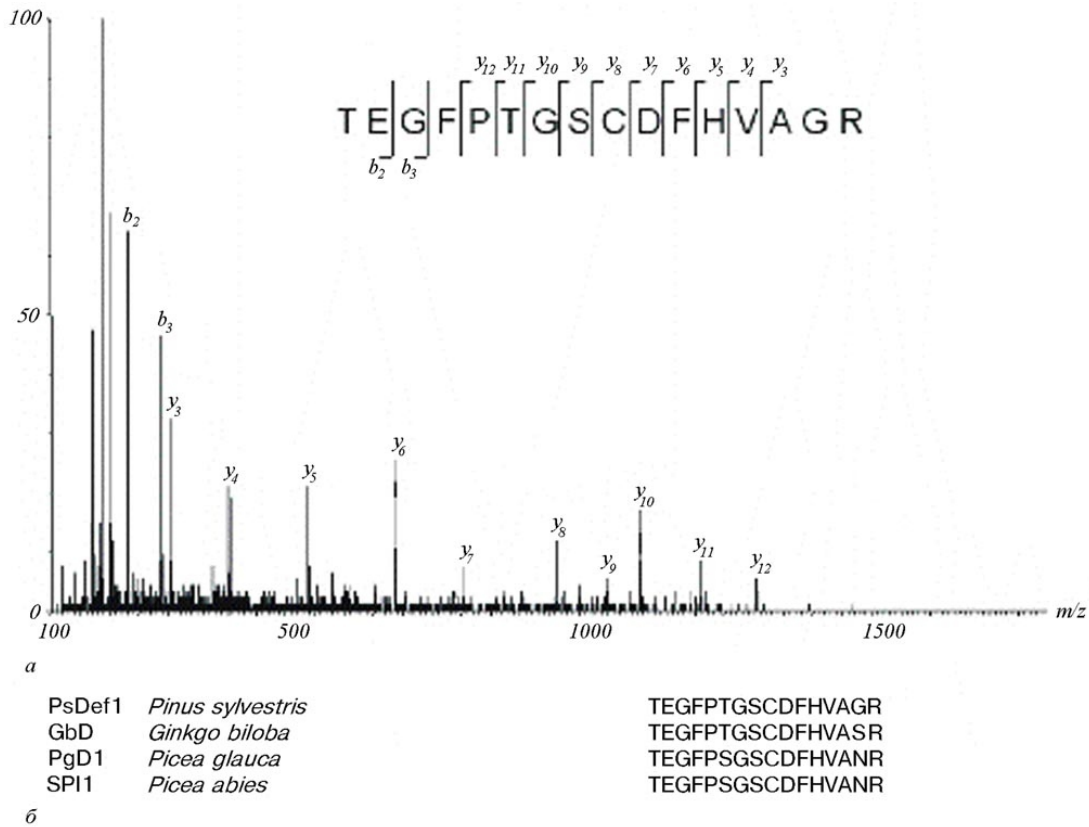


Рис. 2. Мас-спектральний аналіз пептиду, що відповідає амінокислотній послідовності TEGFPTGSCDFHVAGR (*a*) та порівняння амінокислотної послідовності триптичного пептиду дефензину 1 сосни з відповідними пептидами дефензинів голонасінних (*б*)

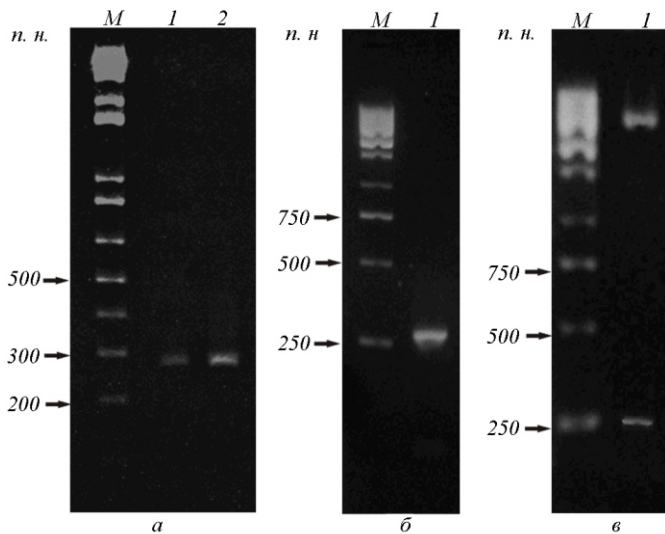


Рис. 3. Клонування кДНК дефензину 1 сосни звичайної: *a* – продукти ПЛР реакції, одержані ампліфікацією первинної бібліотеки кДНК (*1*) та ампліфікованої бібліотеки кДНК (*2*); *M* – 1 kb Plus DNA Ladder «GibcoBRL»; *б* – аналіз плазмиди *pET23d*-PsDef полімеразно-ланцюговою реакцією (*1*); *M* – 1 kb DNA Ladder «Fermentas»; *в* – рестрикційний аналіз плазмиди *pET23d*-PsDef1 за допомогою ендонуклеаз *EcoRI* та *NcoI* (*1*); *M* – 1 kb DNA Ladder «Fermentas»

ампліфікованої ДНК очікуваної довжини – 270 п. н. (рис. 3, *a*). Отриманий продукт клонували у вектор *pET 23d(+)*, яким трансформували клітини *E. coli* штаму XL-1 Blue. Присутність кДНК у плазміді підтверджено ПЛР (рис. 3, *б*) і рестрикційним аналізом (рис. 3, *в*).

У результаті секвенування клонованого фрагмента ДНК отримано нуклеотидну послідовність кДНК дефензину 1 сосни звичайної довжиною 252 п. н. (рис. 4, *a*), яку задепоновано в GenBank під номером EF455616. Амінокислотна послідовність, яку кодує отримана клонована ДНК, містить визна-

```

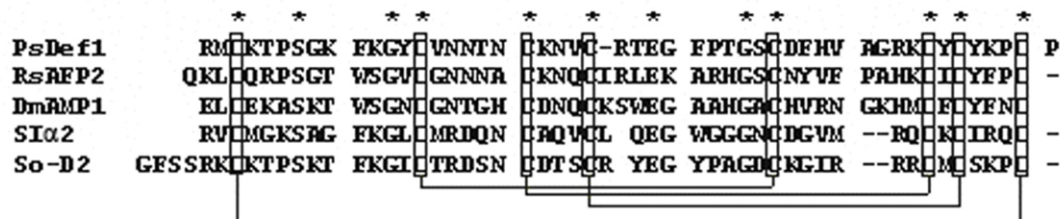
ATGGCGGGCARGGGAGTTGGCAGTGGACTCAGCACTCTTTTTCGCTCGTGTCTTGTT 60
M A G K G V G S R L S T L F L L V L L V 20
ATAACCATTGGGATGATGCAGGTTCAAGTTGCAGAGGGCCGARTGTCARRAACC CGAGC 120
I T I G M M Q V Q V A E G R M C K T P S 40
GGCAGTTTCARRAGGGTATTGTGTGACCAACCAACTGCARRAATGTTTGCCGCACTGAG 180
G K F K G Y C V N N T N C K N V C R T E 60
GGATTTCCARCGGGAGTTGCGATTTCCATGTGGCTGCCAGAAATGTTACTGTTACAAA 240
G E P T G S C D F H V A G R K C Y C Y K 80
CCCTGCCCTTG 252
P C P 83
    
```

a

```

PsDef1 1 RMCKTPSGKF KGYCVNNTNC KNVCRTEGEP TGSCDEHVAG RRCYCYKPCP 50
GbD 1 RTCKTQSGKF KGYCLSDTNC RNVCRTEGEP TGSCDEHVAS RRCYCYKPCV 50
SPI1 1 RTCKTPSGKF KGVCRASNNC KNVQTEGEP SGSCDEHVAN RRCYCSKPCP 50
PgD1 1 RTCKTPSGKF KGVCRASNNC KNVQTEGEP SGSCDEHVAN RRCYCSKPCP 50
SPI1B 1 RTCKTPSGKF KGVCRSRNNC KNVQTEGEP SGSCDEHVAN RRCYCSKPCP 50
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

b



c

Рис. 4. Нуклеотидна та виведена амінокислотні послідовності PsDef1 (a: суцільною лінією підкреслено послідовність сигнального пептиду, пунктирною – амінокислотну послідовність триптивного пептиду дефензину 1 сосни за даними мас-спектрометричного аналізу) та порівняння амінокислотної послідовності дефензину 1 сосни звичайної з амінокислотними послідовностями дефензинів голонасінних (б) та представників різних груп рослинних дефензинів (в) (послідовності сигнальних пептидів видалено; рирочки вставлено для максимального вирівнювання послідовностей; зірочками позначено ідентичні амінокислоти; у прямокутниках – консервативні залишки цистеїну; лінії, що їх з'єднують, відповідають дисульфідним зв'язкам). Абревіатури: PsDef1 – defensin 1 *Pinus sylvestris* (accession no. EF455616); GbD – defensin precursor *Ginkgo biloba* (accession no. AY695796); SPI1 – putative gamma-thionin protein *Picea abies* (accession no. X91487); PgD1 – defensin *Picea glauca* (accession no. AY494051); SPI1B – putative plant defensin *Picea abies* (accession no. AF548021); RsAFP2 – antifungal protein 2 *Raphanus sativus* (accession no. U18556); DmAMP1 – defensin *Dahlia merckii* (accession no. AAB34972); SI 2 – inhibitor of insect alpha-amylases 2 *Sorghum bicolor* (accession no. P21924); So-D2 – antimicrobial peptide D2 *Spinacia oleracea* (accession no. P81571)

чений мас-спектрометрією пептид ендегенного дефензину. Послідовність кДНК PsDef1 має 84 % ідентичності з іншими дефензинами родини *Pinaceae* і 77 % – з представником *G. biloba* родини *Ginkgoaceae*.

Аналіз виведеної амінокислотної послідовності дефензину 1 сосни звичайної (83 а. з.) за допомогою програми SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) виявив присутність N-кінцевого сигнального пептиду з 33 а. з., що є характерною ознакою рослинних дефензинів, які є секреторними білками. Зріла форма PsDef1, як і інших дефензинів голонасінних, складається з 50 а. з. (рис. 4, б). Розрахункова моле-

кулярна маса 5601,6 Да підтверджує результати електрофоретичного аналізу (рис. 1, б). На основі амінокислотної послідовності, використавши програму pI/Mw [21], ми отримали значення ізоелектричної точки 8,9.

Внаслідок пошуку відомих доменів в амінокислотній послідовності PsDef1 за допомогою програми Motif Scan (scansite.mit.edu/motifscan), встановлено, що а. з. з 35-го по 83-й утворюють структуру, відому як gamma-thionin, звідси походить і перша назва рослинних дефензинів – «-тіоніни». Цей домен складається з -спіралі та трьох антипаралельних -шарів, з'єднаних чотирма дисульфідними

мітками [2]. Характерною особливістю цього домену є те, що лише 23 % а. з. є консервативними – це вісім цистеїнів (позиції 4, 15, 21, 25, 36, 45, 47 та 51), два гліцини (13 та 34), серин (8), ароматичний залишок на 11-й позиції та глютамінова кислота на 29-й (відлік ведеться відносно RsAFP2 – найвивченішого рослинного дефензину) (рис. 4, в).

Детальний аналіз первинної структури дефензину 1 сосни і відомих дефензинів з роду *Picea* дозволив виявити 81 % ідентичності цих білків, високий ступінь гомології вказує на можливу подібність їхньої біологічної активності. Відомо, що надекспресія SPI1 в ембріональних клітинах *P. abies* L. підвищує стійкість цих клітин до інфікування грибом *Heterobasidion annosum* [22]. Нещодавно нами показано високу активність ендегенно-го PsDef1 щодо фітопатогенних грибів з родів *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis in vitro* [14, 23].

Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей PsDef1 і дефензинів з різних груп – RsAFP2 (група I), DmAMP1 (II), SI 2 (III) та So-D2 (IV) виявив високий рівень гомології з RsAFP2 (58 %) і So-D2 (59 %). Літературні дані свідчать про високу антифунгальну активність цих рослинних дефензинів, величина IC₅₀ (концентрація білка, за якої на 50 % пригнічується ріст гриба) стосовно грибів з роду *Fusarium* менша за 1 мкМ [7, 23]. Для PsDef1, як встановлено нами раніше, вона дорівнює 0,7 мкМ [14, 24]. Характерною рисою цих дефензинів є високий позитивний заряд: за рН 7,0 молекула дефензину 1 сосни має заряд +6,7, близькі значення у RsAFP2 (група I) – +5,8 та So-D2 (IV) – +7,6, а численними дослідженнями показано, що антифунгальна активність АМП прямо залежить від величини позитивного заряду молекули [24].

У попередніх роботах нами показано, що ендегенний дефензин 1 сосни спричинює морфологічні зміни міцелію гриба. Це дає підстави віднести його до морфогенної I групи дефензинів [14]. Як встановлено експериментами з сайт-спрямованого мутагенезу, біологічна активність кожної групи дефензинів пов'язана з невеличкою консервативною послідовністю, що властива лише цій групі, або навіть з однією амінокислотою. Порівняльний аналіз первинної структури PsDef1 та RsAFP2 дозволив виявити високогомологічну ділянку (2–10

а. з.), гідрофобну ділянку (38–41 а. з.), яка є дуже важливою для антифунгальної дії як сайт зв'язування з гіпотетичним рецептором на мембрані гриба. Заміна у RsAFP2 Tyr38 на Gly, який знаходиться на цій позиції у дефензинів II та III груп, призводила до зміни конформації білка і втрати його активності, у PsDef1 це положення займає гомологічна ароматична амінокислота – фенілаланін. Для цих білків консервативним є залишок Lys44, заміна якого на нейтральний залишок суттєво зменшувала антифунгальну активність RsAFP2 [25]. Беручи до уваги наведені дані про структурну гомологію PsDef1 і Rs-AFP2, можна припустити і подібність молекулярних механізмів антифунгальної дії.

Таким чином, ми вперше клонували дефензин 1 сосни звичайної, що відкриває можливості для: 1) отримання рекомбінантного білка та дослідження його біохімічних, структурних і функціональних властивостей; 2) створення специфічних антитіл до дефензину 1 та вивчення його експресії у тканинах сосни звичайної за різних умов; 3) з'ясування механізму дії рослинних дефензинів на патогенні організми.

V. A. Kovalyova, I. T. Gout, R. G. Kiyamova, V. V. Filonenko, P. T. Gout

Cloning and analysis of defensin 1 cDNA from Scots pine

Summary

Antifungal protein with a molecular weight 5.6 kDa was purified from 7-days old Scots pine seedlings. LC-MS/MS analysis revealed this protein to belong to plant defensins. A pine defensin 1 cDNA (PsDef1), 252 b. p. long, was obtained by PCR amplification from Pinus sylvestris L. cDNA library and was cloned into vector pET 23d(+). PsDef1 cDNA encodes 83-amino acid protein with 33-amino acid N-terminal signal peptide. The mature protein is characterized by the presence of specific conserved residues common to all plant defensins. Structural and functional similarity between PsDef1 and defensins of group I has been shown.

Key words: Scots pine, defensin PsDef1, molecular cloning.

V. A. Ковалева, И. Т. Гут, Р. Г. Киямова, В. В. Филоненко, Р. Т. Гут

Клонирование и анализ кДНК дефензина 1 сосны обыкновенной

Резюме

Антифунгальный белок с молекулярной массой 5,6 кДа очищен из корней семидневных проростков сосны обыкновенной. Масс-спектрометрическим анализом показана його принадлежность к растительным дефензинам. кДНК дефензина 1 сосны (PsDef1) длиной 252 п. н. получена методом

ПЦР-ампліфікації із кДНК бібліотеки *Pinus sylvestris* L. у клонирована в вектор pET23d(+). PsDef1 кДНК кодує белок із 83 амінокислотних остатків (а. о.) з N-концевим сигнальним пептидом із 33 а. о. Для зрелої форми характерно наличие специфических консервативных остатків, свойственных всем растительным дефензинам. Показано структурное и функциональное сходство между PsDef1 и дефензинами группы I.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, дефензин PsDef1, молекулярное клонирование.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Selitreffkoff C. P. Antifungal proteins // Appl. Environ. Microb.—2001.—**67**.—P. 2883–2894.
- Broekaert W. F., Cammue B. P. A., De Bolle M. F. C., Thevissen K., De Samblanx G. W., Osborn R. W. Antimicrobial peptides from plants // Crit. Rev. Plant. Sci.—1997.—**16**.—P. 297–323.
- Garcia-Olmedo F., Molina A., Alamillo J. M., Rodrigues-Palenzuela P. Plant defence peptides // Biopolymers.—1998.—**47**.—P. 479–491.
- Thomma B. P. H. J., Cammue B. P. A., Thevissen K. Plant defensins // Planta.—2002.—**216**.—P. 193–202.
- Gao A. G., Hakimi S. M., Mittanck C. A., Wu Y., Woerner B. M., Stark D. M., Shah D. M., Liang J., Rommens C. M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide // Nat. Biotechnol.—2000.—**18**.—P. 1307–1310.
- Lay F. T., Brugliera F., Anderson M. A. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia // Plant Physiol.—2003.—**131**.—P. 1283–1293.
- Osborn R. W., De Samblanx G. W., Thevissen K., Goderis I., Torrekenes S., vanLeuven F., Attenborough S., Rees S. B., Broekaert W. F. Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae // FEBS Lett.—1995.—**368**.—P. 257–262.
- Chen K. C., Lin C. Y., Kuan C. C., Sung H. Y., Chen C. S. A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid // J. Agr. and Food Chem.—2002.—**50**.—P. 7258–7263.
- Wijaya R., Neumann G. M., Condron R., Hughes A. B., Polya G. M. Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin // Plant. Sci.—2000.—**159**.—P. 243–255.
- Segura A., Moreno M., Molina A., Garcia-Olmedo F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*) // FEBS Lett.—1998.—**435**.—P. 159–162.
- Shen G., Pang Y., Wu W., Miao Z., Qian H., Zhao L., Sun X., Tang K. Molecular cloning, characterization and expression of a novel jasmonate-dependent defensin gene from *Ginkgo biloba* // J. Plant Physiol.—2005.—**162**.—P. 1160–1168.
- Pervieux I., Bourassa M., Laurans F., Hamelin R., Seguin A. A spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatments // Physiol. Mol. Plant Pathol.—2004.—**64**.—P. 331–341.
- Sharma P., Lönneborg A. Isolation and characterization of a cDNA encoding a plant defensin-like protein from roots of Norway spruce // J. Plant Mol. Biol.—1996.—**31**.—P. 707–712.
- Ковальова В. А., Гут І. Т., Гут П. Т. Характеристика двох дефензиноподібних білків з проростків сосни звичайної // Біополімери і клітина.—2006.—**22**, № 2.—С. 126–131.
- Ковальова В. А., Гут П. Т. Новий метод виділення білка з протигрибковою активністю з проростків насіння сосни звичайної // Наук. вісн. НЛТУ України.—2005.—**15.4**.—С. 30–34.
- Ковальова В. А., Гут П. Т. Виділення білків із фунгіцидною активністю з проростків сосни звичайної // Физиология и биохимия культурных растений.—2007.—**39**.—С. 114–120.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—**15**.—P. 680–685.
- Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kDalton // Anal. Biochem.—1987.—**166**.—P. 368–379.
- Ковальова В. А., Гут П. Т. Створення та аналіз бібліотеки генів сосни звичайної // Наук. вісн. НЛТУ України.—2007.—**17.3**.—С. 30–34.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—480 с.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server // The proteomics protocols handbook / Ed. J. M. Walker.—New York: Humana press, 2005.—P. 571–608.
- Elfstrand M., Fossdal C. G., Swedjemark G., Clapham D., Olsson O., Sitbon F., Sharma P., Lönneborg A., von Arnold S. Identification of candidate genes for use in molecular breeding: a case study with the Norway spruce defensin-like gene, SPI1 // Silvae Genet.—2001.—**50**.—P. 75–81.
- Terras F. R. G., Schoofs H. M. E., De Bolle M. F. C., Van Leuven F., Rees S. B., Vanderleyden J., Cammue B. P. A., Broekaert W. F. Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds // J. Biol. Chem.—1992.—**267**.—P. 5301–5309.
- Ковальова В. А., Гут І. Т., Гут П. Т. Очистка та характеристика дефензину з коренів *Pinus sylvestris* L. // Матеріали ІХ Укр. біохім. з'їзду (24–27 жовтня 2006 р., Харків).—С. 45–46.
- De Samblanx G. W., Goderis I., Thevissen K., Raemaekers R., Fant F., Borremans F., Acland D. P., Osborn R. W., Patel S., Broekaert W. F. Mutational analysis of plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity // J. Biol. Chem.—1997.—**272**.—P. 1171–1179.

УДК 577.112.083

Надійшла до редакції 02.07.07