آنالیز فیلوژنتیکی و بیوانفورماتیکی cDNA رمزگردان کیتیناز *Fenneropenaeus mergueinsis*

آزاده بیگمرادی[1]، احمد همایی[2] ، روح الله همتی [3]، بهناز صفار [4]

1- دانشجو دکترای تخصصی زیست شناسی جانوران دریا، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

2- دانشیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

3- استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

4- دانشیار زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

پست الکترونیک نویسنده مسئول: a.homaei@hormozgan.ac.ir

تاریخ دریافت: 1399/10/8 تاریخ پذیرش: 1399/11/6

چکیده

کیتینازها جزء آنزیم‌های ضروری سخت پوستان می‌باشند که در چرخه پوست‌اندازی و هضم کیتین نقش مهمی ایفا می‌کنند. بر اساس مطالعه حاضر، cDNA رمزگردان کیتیناز از *Fenneropenaeus mergueinsis* با طول 1404 bp شامل 467 اسید آمینه با روش RT-PCR تعیین توالی شد و سپس آنالیز فیلوژنیکی و بیوانفورماتیکی آن انجام شد. توالی جدید در بانک ژنی با شماره دستیابی MT250539ثبت شد و وزن مولکولی پروتئین حاصل از این توالی 51/84 KDa و نقطه ایزوالکتریک تئوریکال 4/79 پیش‌بینی شد. مقایسه توالی آمینو اسیدی در بین کیتینازهای پنائید بیشترین همسانی (حدود 97 تا 92 %) به ترتیب با *P. mondon* chi-3، *F. chinensis*، *P. vannamei* و *P. japonicus* chi-3 نشان داد. بررسی‌های فیلوژنتیکی نشان داد که کیتیناز مطالعه حاضر متعلق به کیتینازهای گروه 3 می‌باشد. آنالیزهای الگوی پروتئینی آشکار شده است، نشان داد که کیتیناز از *F. mergueinsis* شامل دمین کاتالیتیکی Glyco-18 در موقعیت 2-347، یک جایگاه متصل شونده به کیتین پریتروفین A در موقعیت 403-456، یک پل دی سولفیدی شکل گرفته توسط دو سیستئین در موقعیت 421- 436، یک دمین متصل شونده به کیتین نوع 2، جایگاه فعال در موقعیت 117-125 (^{117}FDGLDMDWE^{125})، یک ناحیه غنی از پرولین / ترئونین در موقعیت های 376-412 و یک جایگاه مفروض N – گلیکوزیلاسیون در موقعیت 424- 427 (NTSG) می باشد. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که توالی *F. mergueinsis* حاوی موتیف‌های کیتیناز فعال و مشابه با کیتینازهایی است که قبلاً تعیین توالی شده‌اند و درصورت کلونینگ، بیان و تخلیص احتمالاً ویژگی‌های کارکردی و ساختاری مشابه آنزیم‌ها گونه‌های مورد اشاره بالا را دارد.

کلیدواژگان: کیتیناز، فیلوژنی، بیوانفورماتیک، CDNA، *Fenneropenaeus mergueinsis*

مقدمه

کیتین، فراوان‌ترین ترکیب زیستی بعد از سلولز می‌باشد. این هومو پلیمر خطی از واحدهای β- N- استیل گلوکز آمین با پیوندهای β- (1-4) ساخته شده است. این بیوپلیمر بطور فراوانی در طیف وسیعی از موجودات شامل بندپایان، قارچ‌ها، نرم تنان، نماتودها، فلس‌های ماهیان و سخت پوستان یافت می شود [1، 2]. هیدرولیز کیتین توسط آنزیم‌های کیتینولیتیکی انجام می‌شود. آنزیم‌های کیتینولیتیکی متعلق به خانواده های گلیکوزید هیدورلازها (GH) بوده که بر اساس شباهت توالی آمینو اسیدی شان به دو دسته اندوکیتینازها شامل گروه‌های GH18، GH19، GH23 و GH48 و β- N- استیل هگزو آمینیدازها شامل گروه‌های GH3، GH5، 18، GH20، GH84 و GH116 رده‌بندی می‌شوند [3]. میگوهای پنائید گروهی متنوع از دکاپودهای دریایی را تشکیل داده که دارای بیشترین فراوانی در آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌باشند [4]. کیتیناز آنزیمی داخلی بوده است که پیوندهای گلیکوزیدی موجود در کیتین را می‌شکافد. کیتیناز موجود در سخت پوستان نقش مهمی در روند پوست‌اندازی، هضم اسکلت خارجی و سنتز اسکلت خارجی جدید در طول رشد سخت پوستان دارند [5]. علاوه بر این، کیتیناز دارای نقش کلیدی بیشتری از جمله هضم غذاهای کیتینوزی، تصفیه پساب های کیتینوزی، دفاع بر علیه پاتوژن‌های قارچی، تخریب آفت‌های حشرات، مکانیسم دفاعی از میزبان و سایر پاسخ های فیزیولوژیکی دارد [6-8]. همچنین در اکوسیستم‌های دریایی، فعالیت آنزیم‌های کیتینولیتیکی برای ارزیابی خطرات اکولوژیکی مرتبط با آلودگی اکوسیستم استفاده می‌شود [9]. نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که کیتیناز شناسایی شده از *Litopenaeus vannamei* در تنظیم ایمنی [10]، کیتیناز 4 از *P. mondon* در پاسخ به استرس، ایمنی و پوست اندازی [11]، کیتیناز از *L.vannamei* در ایمنی [5]، کیتینازهای 1، 2 و 3 در *P. mondon* در هضم کیتین اسکلت خارجی طی دوران پوست اندازی [12]، کیتیناز 3 از *Fenneropenaeus chinensis* در هضم غذاهای کیتینوزی [13]، کیتیناز 3 از *japonicusPenaeus* در دفاع [14]، کیتیناز 1 از *Penaeus mondon* در روند پوست اندازی [15] و کیتیناز 2 از *Marsupenaeus japonicus* در سیکل پوست اندازی [16] نقش اساسی دارند. اولین ژن کد کننده کیتیناز برای اولین بار در میگوی *M. japonicus* شناسایی شد. سپس بعد از آن علاقه ی محققین برای شناسایی و توصیف سایر ژن‌های مشابه از میگوهای پنائید از جمله *L.vannamei*، *F. chinensis* و *P. mondon* برانگیخته شد. با این حال، تاکنون هیچ گزارشی در مورد شناسایی مولکولی cDNA کد کننده کیتناز از *F. mergueinsis* وجود ندارد. همچنین درک ما از آنزیم های کیتینولیتیکی دریایی، به علت کمبود اطلاعات ژنتیکی و ویژگی‌های بیوشیمیایی مربوط به آنها محدود می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی فیلوژنتیکی مولکولی cDNA کد کننده کیتیناز از *F. mergueinsis* و روشن کردن روابط فیلوژنتیکی بین آن با سایر ژن‌های کد کننده کیتیناز سایر میگوهای موجود در بانک ژن می باشد. آنزیم کیتیناز در پزشکی، بیوتکنولوژی، کشاورزی و صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد و بررسی فیلوژنتیکی آنها نیز اهمیت دارد. تاکنون هیچ مطالعه فیلوژنتیکی بر روی ژن کیتیناز از گونه *F. mergueinsis* انجام نشده است. اگر ما ویژگی های آنزیمی سایر گونه‌های مطالعه شده را بدانیم با کمک اطلاعات روابط فیلوژنتیکی تحقیق حاضر می‌توان پیش بینی کرد که رابطه تکاملی ژن مورد نظر در گونه‌های مختلف میگو به چه صورتی است و فرضیات تکاملی دقیق‌تری را ارائه داد. اگر بر اساس نتایج فیلوژنی، خصوصیات فیلوژنتیکی گونه حاضر با گونه‌های قبلی شباهت زیادی داشته باشد باشد، می‌توان پیش بینی کرد که ویژگی‌های آنزیم کیتیناز آن گونه ها مشابه گونه ما باشد و اگر روی دیگر گونه‌های مشابه قبلاً مطالعات ساختار و عمل آنزیم کیتیناز از *F. mergueinsis* پژوهش انجام شده باشد در این صورت

توجیه زیادی برای بررسی ساختار و عمل آنزیم *F. mergueinsis* باقی نمی‌ماند. چنان چه شرایط برعکس حالت قبل باشد می توان پیش بینی کرد که آنزیم کیتیناز از گونه ***F. mergueinsis*** از نظر ساختار و عملکرد احتمالاً دارای ویژگی‌های متفاوت با دیگر گونه‌ها است و توجیه بیشتری برای پژوهش ساختار و عمل آنزیم کیتیناز آینده باقی می‌ماند. به طور کلی و صرف نظر از حالتی که توضیح داده شد، هدف اصلی از این مطالعه کسب اطلاعات بیشتر در زمینه فیلوژنی ژن کیتیناز در گونه *F. mergueinsis* و مقایسه آن با دیگر گونه‌های میگو جهت ارائه فرضیه‌های تکاملی صحیح‌تر و دقیق‌تر در خصوص این ژن است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های *F. mergueinsis*

تعداد 25 عدد میگوی *F. mergueinsis* از موقعیت جزیره هرمز واقع شده در خلیج فارس نمونه‌برداری شد. هپاتوپانکراس‌ها با استفاده از تیغ اسکالپر استریل شده با اتانول 95% جداسازی و با آب مقطر شستشو داده شدند. هپاتوپانکراس ها به درون تانک حاوی نیتروژن مایع انداخته شد و به آزمایشگاه منتقل گردید.

استخراج RNA، سنتز cDNA و PCR

جهت استخراج RNA کلیه لوازم مورد نیاز با محلول DEPC 1% استریل شد. RNA کل از هپاتوپانکراس *F. mergueinsis* توسط کیت استخراج RNA کل با محلول RNX-Plus Reagent (SinaClon) بر طبق دستور العمل سازنده کیت استخراج شد. غلظت RNA استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر نانودراپ (Nano Ar 2015) در 260/280 nm سنجیده شد و یکپارچگی آن بر روی الکتروفورز ژل آگارز 1% تعیین شد. مقدار 5 µg از RNA استخراج شده توسط کیت سنتز cDNA (SinaClon) بر طبق دستور العمل سازنده کیت با آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase در 60 دقیقه در 42 ℃، 5 دقیقه در 85 ℃ و 10 دقیقه در 10 ℃ به cDNA سنتز شد. بعد از ساخت cDNA از RNA استخراج شده واکنش PCR انجام شد. واکنش PCR توسط پرایمرهای طراحی شده پیشرو (5′ ATGGTGTGCTACTTCGGCTCGTG 3′) و معکوس (5′ TTAGCAGTCATTCGGGCATACGTC 3′) انجام شد. برای انجام این واکنش در یک میکروتیوب استریل مقادیر 1/5 میکرولیتر از cDNA الگو، 0/6 میکرولیتر هر کدام از پرایمرهای پیشرو و معکوس، 2 میکرولیتر بافر PCR، 6/. میکرولیتر dntp، 0/4 میکرولیتر $MgCl_2$، 0/3 میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلیمراز تا حجم نهایی 25 میکرولیتر با آب دیونیزه وارد شد. واکنش PCR در شرایط 95 °C برای 5 min، در 95 °C برای 45 sec، 30 سیکل 66 °C برای 45 sec، 72 °C برای 2 min و 72 °C برای 10 min انجام شد. پاکسازی محصولات PCR توسط کیت استخراج از ژل و پاکسازی محصولات PCR (Bioneer Korea) Korea Bioneer بر طبق دستورالعمل سازنده کیت انجام شد.

TA کلونینگ

محصولات RT-PCR در وکتور T/A کلونینگ توسط وکتور pTG 19-T (Vivantis) کلون شد. جهت این آزمایش، ابتدا مقدار ورودی[1] به وکتور بر اساس برگه اطلاعاتی کیت محاسبه شد. جهت لیگاسیون مقادیر 2 میکرولیتر وکتور pTG19-T (25 ng/µl)، 6 میکرولیتر ورودی (40 ng/µl)، 1 میکرولیتر بافر 10X لیگاز، 1 میکرولیتر آنزیم T4 DNA لیگاز تا حجم نهایی 12 میکرولیتر با آب دیونیزهوارد یک میکروتیوب استریل شد. سپس انکوباسیون در دمای 16 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز انجام شد. ترانسفورماسیون در سلول مستعد باکتری DH5α انجام شد. محصول ترانسفورماسیون روی پلیت LB کشت و به انکوباتور 37

1. Insert

درجه سانتی‌گراد به مدت 16 ساعت منتقل شد. برای تأیید کلونینگ واکنش کلونی PCR مطابق شرایط ذکر شده انجام شد. سپس پلاسمید نوترکیب مورد نظر توسط کیت استخراج پلاسمید GeneAll، استخراج شده و جهت تعیین توالی به شرکت فزاپژوه ارسال شد. درنهایت توالی ژن مورد نظر در بانک ژن پایگاه NCBI با شماره دستیابی MT250539 ثبت شد.

آنالیزهای بیوانفورماتیکی و پایگاه‌های اطلاعاتی جستجو کننده توالی cDNA کد کننده کیتیناز

ابتدا توالی‌های مربوط به mRNA کیتیناز از سایت NCBI دریافت شد، سپس با استفاده از ابزار Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) هم تراز شد. Open reading frames (ORFs) با استفاده از ORF finder پیش بینی شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنزیم با برنامه ProtParam پیش‌بینی شد. دمین‌های محافظت شده هر آنزیم با استفاده از نرم‌افزار آنلاین (Conserved Domains online software) بررسی شد. موتیف‌های آنزیم با استفاده از نرم‌افزار آنلاین (https://myhits.sib.swiss/) بررسی شد. پیشگویی ساختار سه بعدی پروتئین با نرم افزار آنلاین (https://swissmodel.expasy.org) انجام‌شد. بررسی‌های مربوط به الگوی پروتئین با برنامه prosite (https://prosite.expasy.org/) انجام شد. از نرم افزار Clustal W برای تراز بندی چندگانه توالی ها استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش maximum likelihood مدل Tamura-Nei در نرم افزار Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7.0) با بوت استرپ 1000 تکرار ترسیم شد. اطلاعات مربوط به تمامی توالی‌های استفاده شده در ساخت درخت فیلوژنتیکی در جدول 1 نشان داده شده است.

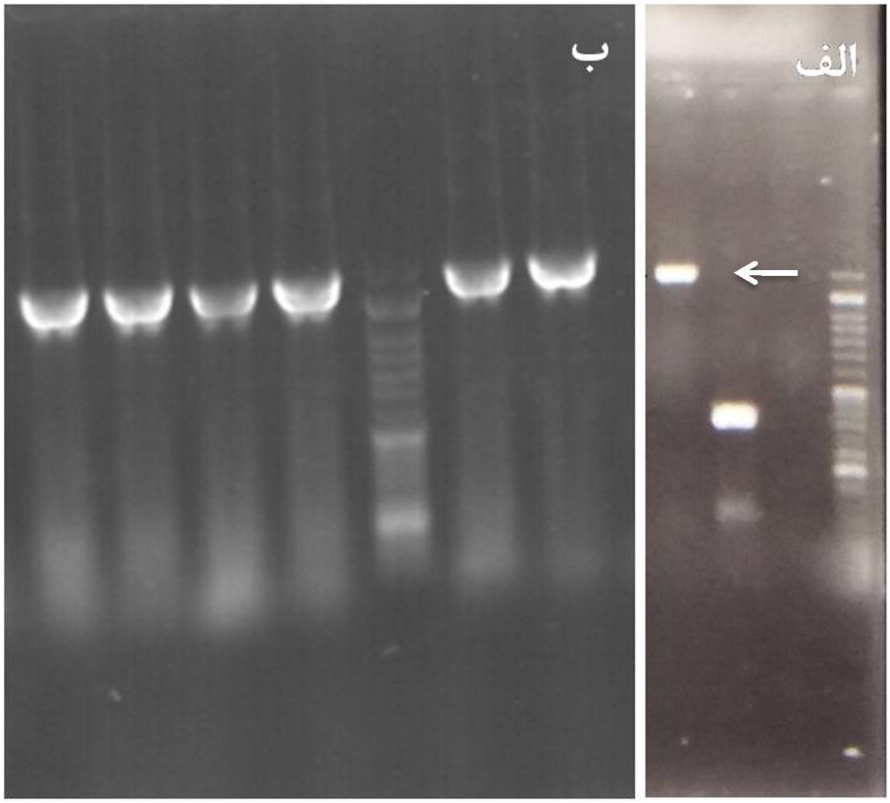
جدول 1- اطلاعات مربوط به توالی های استفاده شده در ساخت درخت فیلوژنتیکی

گروه‌ها کیتیناز	گونه‌ها	نام رایج	شماره دستیابی نوکلئوتید/ پروتئین	جفت بازها	RNA جداشده از
گروه I (chi-1)	*Litopenaeus vannamei*	میگوی سفید آرام	EU883591/ACG60513	1893	بافت های مخلوط
	Penaeus monodon	میگوی سیاه ببری	AF157503/AAD40313	2457	هپاتوپانکراس
	Fenneropenaeus chinensis	میکوی سفید چینی	DQ277710/ABB85237	2464	
گروه II (chi-2)	*Marsupenaeus japonicus*	میگو کوروما	D84250/BAA12287	2078	هپاتوپانکراس
	Penaeus monodon	میگو سیاه ببری	KX610684/APL97142	2050	
	Marsupenaeus japonicus	میگو کوروما	D89751/BAA14014	1584	بافت های کوتیکولی
گروه III (chi-3)	*Litopenaeus vannamei* 1	میگوی سفید آرام	EU381118/ABY70643	1467	بافت های مخلوط
	Litopenaeus vannamei 2	میگوی سفید آرام	AF315689/AAN74647	1594	هپاتوپانکراس
	Fenneropenaeus chinensis	میگوی سفید چینی	DQ000159/AAY44300	1616	
	Marsupenaeus japonicus	میگو کوروما	AB008027/BAA22854	1493	هپاتوپانکراس
مطالعه حاضر	*Fenneropenaeus merguiensis*	میگو موزی	MT250539/QKY67874	1404	هپاتوپانکراس
گروه IV (chi-4)	*Litopenaeus vannamei*	میگوی سفید آرام	FJ888480/ACR23314	2126	بافت های مخلوط
	Penaeus monodon	میگو سیاه ببری	KY210138/AQM56004	2178	هپاتوپانکراس
	Penaeus japonicus	میگوی ببری ژاپنی	MN480759/QGA66984	2124	
گروه V (chi-5)	*Litopenaeus vannamei* 1	میگوی سفید آرام	MH001173/AWD73767	2557	آبشش
	Litopenaeus vannamei 2	میگوی سفید آرام	FJ888481/ACR23315	1665	بافت های مخلوط
	Penaeus monodon	میگوی سیاه ببری	KY865407/ARM20252	2860	هپاتوپانکراس و آبشش

یافته‌ها

ویژگی‌های cDNA کد کننده کیتیناز از *F. mergueinsis*

پس از ارسال نمونه‌های تکثیر شده cDNA رمزگردان کیتیناز و دریافت نتایج تعیین توالی مشخص شد که توالی جدید است و طول cDNA کد کننده کیتیناز *F. mergueinsis*، 1404 bp بود (شکل 1) که به 467 رزیدوی اسید آمینه ترجمه شد و در بانک ژنی به شماره دستیابی MT250539 ثبت شد. با استفاده از برنامه آنلاین Expasy پیش‌بینی شد که توالی آمینواسیدی پیشگویی شده دارای وزن مولکولی KDa 51/84 و PI تئوریکال 4/79 می باشد. توالی پروتئینی کیتیناز این مطالعه دارای بیشترین درصد آمینو اسیدی به ترتیب در Ala (8.4%)، Gly (8.4%)، Leu (7.9%)، Pro (7.1%) و Thr (6.9%) بود (جدول 2). تعداد کل رزیدوها با بار منفی (Asp + Glu) برابر 58 و تعداد کل رزیدوها با بار مثبت (Arg + Lys) برابر 31 بود.



شکل 1- الف- نتایج واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز که با فلش مشخص شده است و ب- نتایج کلونی PCR. بافر بارگذاری SMOBiO DM 1100

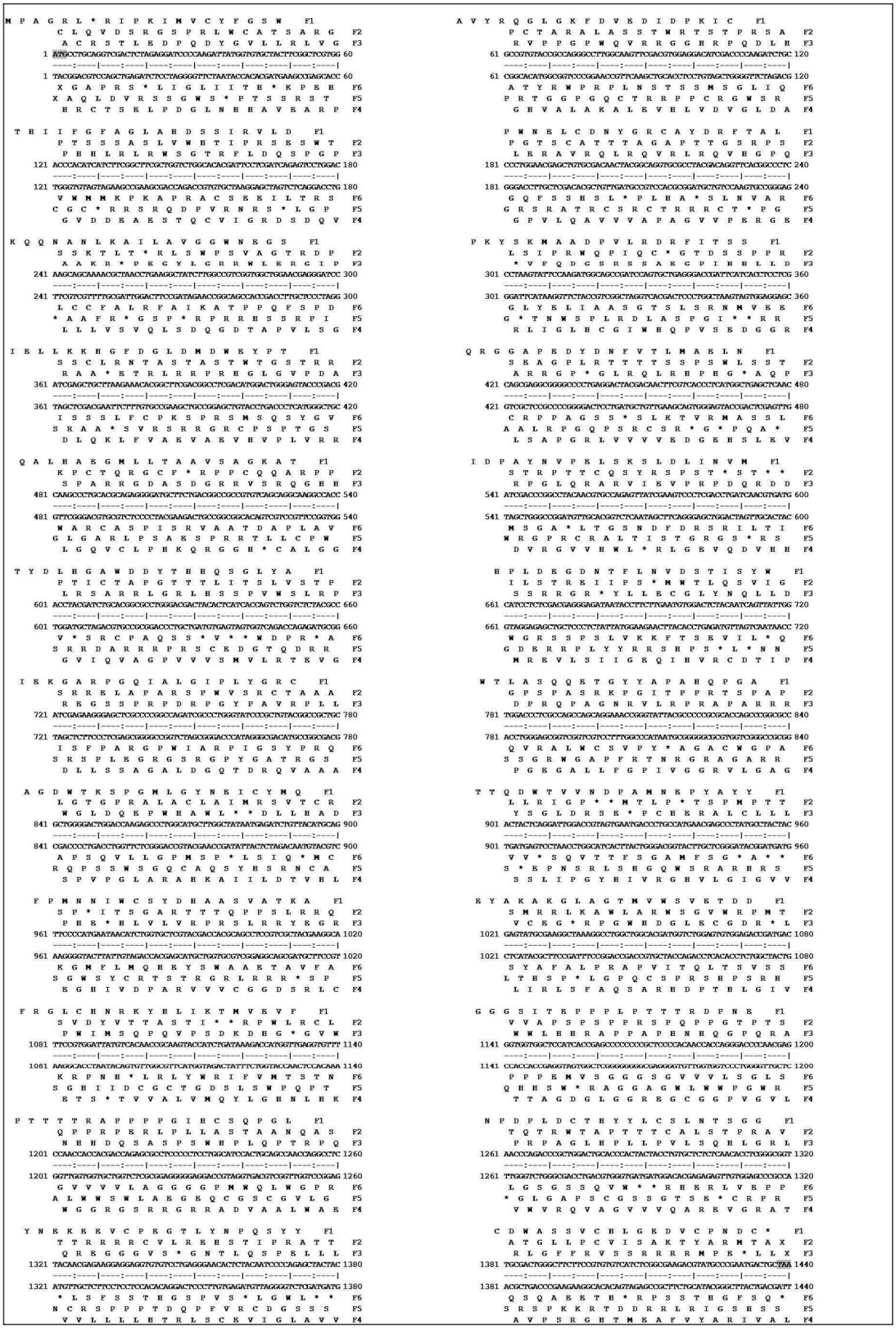
جدول 2- ترکیب بندی آمینو اسیدی آنزیم کیتیناز از *F. mergueinsis*

اسید آمینه	تعداد کل	درصد%	اسید آمینه	تعداد کل	درصد٪
Ala (A)	39	%8/4	Leu (L)	37	%7/9
Arg (R)	13	%2/8	Lys (K)	18	%3/9
Asn (N)	23	%4/9	Met (M)	12	%2/6
Asp (D)	34	%7/3	Phe (F)	12	%2/6
Cys (C)	16	%3/4	Pro (P)	33	%7/1
Gln (Q)	14	%3	Ser (S)	25	%5/4
Glu (E)	24	%5/1	Thr (T)	32	%6/9
Gly (G)	39	%8/4	Trp (W)	12	%2/6
His (H)	15	%3/2	Tyr (Y)	29	%6/2
Ile (I)	19	%4/1	Val (V)	21	%4/5

بررسی های ساختار ژنومی کیتیناز از *F. mergueinsis*

آنالیز توالی های نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی کیتیناز از *F. mergueinsis* مشخص شد (شکل 2). ATG کدون آغازی و TAA کدون پایانی هستند.

بر اساس الگوی پروتئینی آشکار شده و هم ترازی چندگانه رزیدوهای آمینواسیدی از کیتیناز *F. mergueinsis* با توالی کیتیناز گروه 3 گونه‌های *M. japonicas* (Mjchi-3)، *L. vannamei* (Lvchi-3) و *F. chinensis* (Fcchi-3) استنباط شد که شامل دمین کاتالیتیکی Glyco-18 در موقعیت 2-347، یک جایگاه متصل شونده به کیتین (chitin-binding) پریتروفین A در موقعیت 403-456، یک پل دی سولفیدی شکل گرفته است و توسط دو Cys در موقعیت 421 - 436، یک دمین متصل شونده به کیتین نوع 2، جایگاه فعال در موقعیت E125 ([117]FDGLDMDWE[125])، یک ناحیه غنی از پرولین / ترئونین در موقعیت های 376-412 (PPPLPTTTRDPNEPTTTTRAPPPPGIHCTTLGLNPDP) و یک جایگاه مفروض N – گلیکوزیلاسیون در موقعیت 424- 427 (NTSG) می باشد (شکل 3).



شکل 2- توالی های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی پیشگویی شده از کیتیناز *F. mergueinsis*.. با هایلایت خاکستری کدون شروع (ATG) و کدون پایانی (TAA) نشان داده شده است.

```
            ↰Glyco-18 domain
    Mjchi-3
MVCYFGSWAVYRQGLGKFDVEDIDPKICTHIVFGFAGLAADSSIRVLDPWNELCDNYGKC      60
    Lvchi-3
MVCYFGSWAAYRQGLGKFDVEDIDPKICTHIIFGFAGLAHDSSIRVLDPWNELCDNYGKC      60
    Fcchi-3
MVCYFGSWAVYRQGLGKFDVEDIDPKICTHIIFGFAGLAHDSSIRVLDPWNELCDNYGKC      60
    Fmchi      MVCYFGSWAVYRQGLGKFDVEDIDPKICTHIIFGFAGLAHDSSIRVLDPWNELCDNYGRC  60
            *********.********************:******* ******************:*
                                Chitinases family 18 active site
    Mjchi-3
AYDRFTALKQQNANLKALLAVGGWNEGSPKYSKMAADPALRNRFITSSIELLKKHGFDGL      120
    Lvchi-3
AYDRFTALKQQNANLKAILAVGGWNEGSPKYSKMAADPVLRNRFITSSIELLKKHGFDGL      120
    Fcchi-3
AYDRFTALKQQNANLKAILAVGGWNEGSPKYSKMAADPVLRERFITSSIELLKKHGFDGL      120
    Fmchi
AYDRFTALKQQNANLKAILAVGGWNEGSPKYSKMAADPVLRDRFITSSIELLKKHGFDGL      120
            *****************:*******************.**:******************

    Mjchi-3
DMDWEYPTQRGGSPDDYDNFAILMAELKQALQPEGMLLTAAVSAGKATIDPAYNVPEISK      180
    Lvchi-3
DMDWEYPTQRGGSPDDYDNFVILMAELNQALHAEGMLLTAAVSAGKATIDPAYNVPELSK      180
    Fcchi-3
DMDWEYPTQRGGVPEDYDNFVILMAELNQALHAEGMLLTAAVSAGKATIDPAYNVPELSK      180
    Fmchi
DMDWEYPTQRGGAPEDYDNFVTLMAELNQALHAEGMLLTAAVSAGKATIDPAYNVPELSK      180
            ************ *:*****. *****:***: ************************:**

    Mjchi-3
SLDLINVMSYDLHGAWDDYTHHQSGLYAHPLDEGDNLYLNVDFAISYWIEKGARPGQIAL      240
    Lvchi-3
SLDLINVMTYDLHGAWDDYTHHQSGLYAHPLDEGDNAFLNVDFAISYWIEKGARPGQIAL      240
    Fcchi-3
SLDLINVMTYDLHGAWDDYTNHQSGLYAHPLDEGDNTFLNVDFAISYWIEKGARPGQIAL      240
    Fmchi
SLDLINVMTYDLHGAWDDYTHHQSGLYAHPLDEGDNTFLNVDSTISYWIEKGARPGQIAL      240
            ********:************:*************** :**** :****************

    Mjchi-3
GIPLYGRCWTLASQQETGYYAPAHQPGAAGDWTKSPGMLGYNEICYMQTTQDWTVVDDPA 300
    Lvchi-3
GIPLYGRCWTLASQQETGYYAPAHQPGAAGDWTRSPGMLGYNEICYMRTTQDWTVVDDPA 300
    Fcchi-3
GIPLYGRCWTLASQQETGYYAPAHQPGAAGDWTKSPGMLGYNEICYMQTTQDWTVVDDPA 300
    Fmchi
GIPLYGRCWTLASQQETGYYAPAHQPGAAGDWTKSPGMLGYNEICYMQTTQDWTVVNDPA 300
            ***********************************:*************:*********:***

    Mjchi-3
MHEPYAYYFPMNNIWCSYDHAASVVTKAEYAKSKGLAGTMVWSVETDDFRGLCHNRKYHL      360
    Lvchi-3
MNEPYTYYFPMNNIWCSYDHAASVAIKAEYAKSKGLAGTMVWSVETDDFRGLCHNRKYHL 360
    Fcchi-3
MNEPYAYYFPMNNIWCSYDHAASVVTKAEYAKSKGLAGTMVWSVETDDFRGLCHDRKYHL      360
```

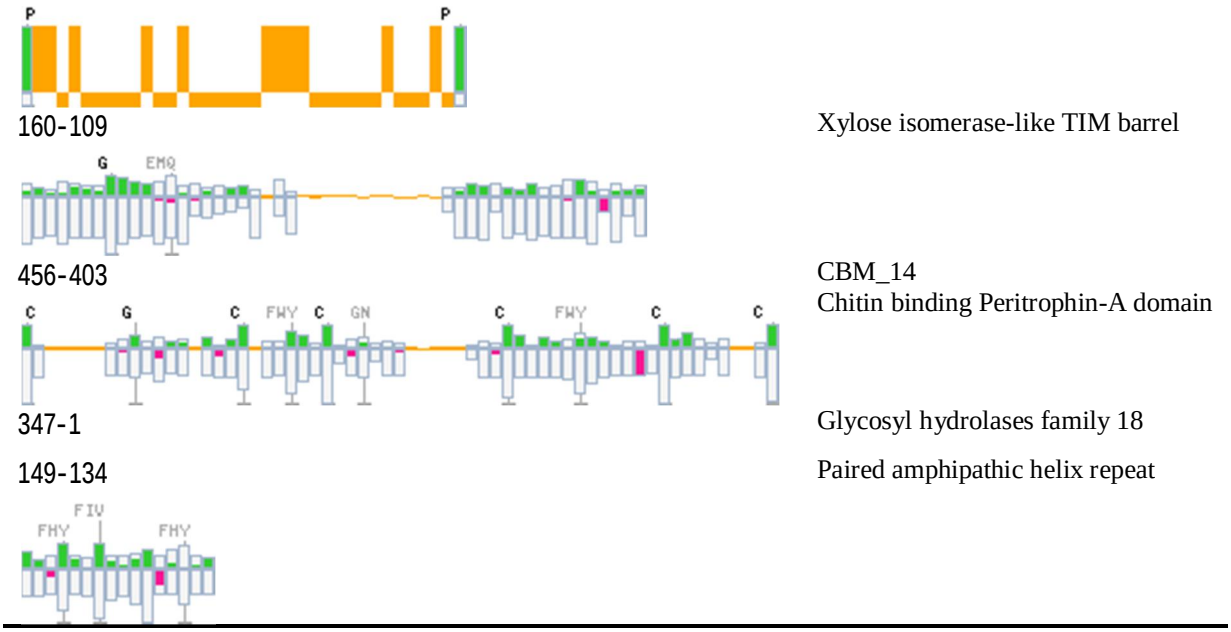
```
Fmchi
MNEPYAYYFPMNNIWCSYDHAASVATKAEYAKAKGLAGTMVWSVETDDFRGLCHNRKYHL          360
        *:***:******************. ******:*********************:*****
                 Proline/Threonine rich region
Mjchi-3    IKTMVEVFGGGSITEPPPLPTTTRDPSEPTTTTRAPPPPGIHCTTLGLNPDPLDCTHYYL    420
Lvchi-3    IKTMVEVFGGGSITEPPPLPTTTRDPNEPTTTTRAPPPPGVHCTQPGLNPDPLDCTHYYL    420
Fcchi-3    IKTMVEVFGGGSITEPPPLPTTTRDPNEPTTTTRAPPPPGVHCSQPGLNPDPLDCKHYYL    420
Fmchi      IKTMVEVFGGGSITEPPPLPTTTRDPNEPTTTTRAPPPPGIHCSQPGLNPDPLDCTHYYL    420
        **************************.*************:**:  *********.****
         Disulfide bridge          ↱Chitin-binding domaim type 2
Mjchi-3    CSLNTSGGFDEKEEVCPEGTLFNPQSFYCDWASSVCYLGDNVCPNDC          467
Lvchi-3    CSLNTSGGYNEKEEVCPEGTLYNPQSYYCDWASSVRHLGEDVCPNDC          467
Fcchi-3    CSLNTSGGYNEKEEVCPEGTLYNPQSYYCDWASSVCHLGEDVCPNDC          467
Fmchi      CSLNTSGGYNEKEEVCPEGTLYNPQSYYCDWASSVCHLGEDVCPNDC          467
        ********::***********:****:******** :**::******
```

شکل 3- هم ترازی توالی آمینو اسیدی ژن کیتیناز از *F. mergueinsis* (Fmchi: این مطالعه) با Mjchi-3 of *M. japonicus* (GenBank accession no. BAA22854)، Lvchi-3 of *L. vannamei* (GenBank accession no. AAN74647) و Fcchi-3 of *F. chinensis* (GenBank accession no. AAY44300).

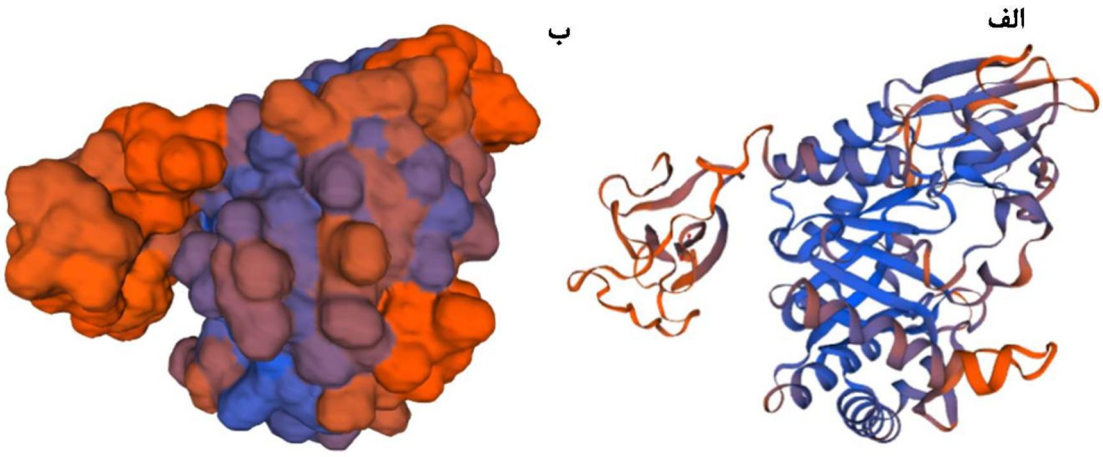
موتیف‌های آنزیم با استفاده از نرم‌افزار آنلاین (https://myhits.sib.swiss) بررسی شد. نتایج اطلاعات موتیف‌های موجود در توالی آمینواسیدی کیتیناز از *F. mergueinsis* در جدول 5 نشان داده شده است.

جدول 3- اطلاعات مربوط به موتیف های موجود در کیتیناز *F. mergueinsis*

موتیف ها	موقعیت توالی آمینواسیدی
N-glycosylation site (ASN-Glycosylation)	427-424 (NTSG)
Casein kinase II phosphorylation site	110-107 (SSIE) 256-253 (SQQE), 292-289 (TTQD), 329-326 (TKAE), 366-363 (TMVE), 375-372 (SITE), 385-382 (TTRD)
N-myristoylation site	160-155 (GMILLTA), 237-232 (GARPGQ), 340-335 (GLAGTM), 356-351 (GLCHNR), 375-370 (GGSITE), 405-400 (GIHCSQ)
Protein kinase C phosphorylation site	45-43 (SIR), 90-88 (SPK), 130-128 (TQR), 384-382 (TTR), 394-392 (TTR)
Tyrosine kinase phosphorylation site	173-166 (KATIDPAY)
Chitinases family 18 active site	125-117 (FDGLDMDWE)
Chitin-binding type-2 domain profile	458-100
Proline-rich region profile	412-376



ساختار سه بعدی پروتئین با استفاده از توالی آمینواسیدی کیتیناز توسط SWISS-MODEL ترسیم شد (شکل 4). از لحاظ همسانی توالی 43/5% با Acidic mammalian chitinase و 37/73% با ساختار کریستالی طول کامل Chitotriosidase-1 از انسان نشان داد.



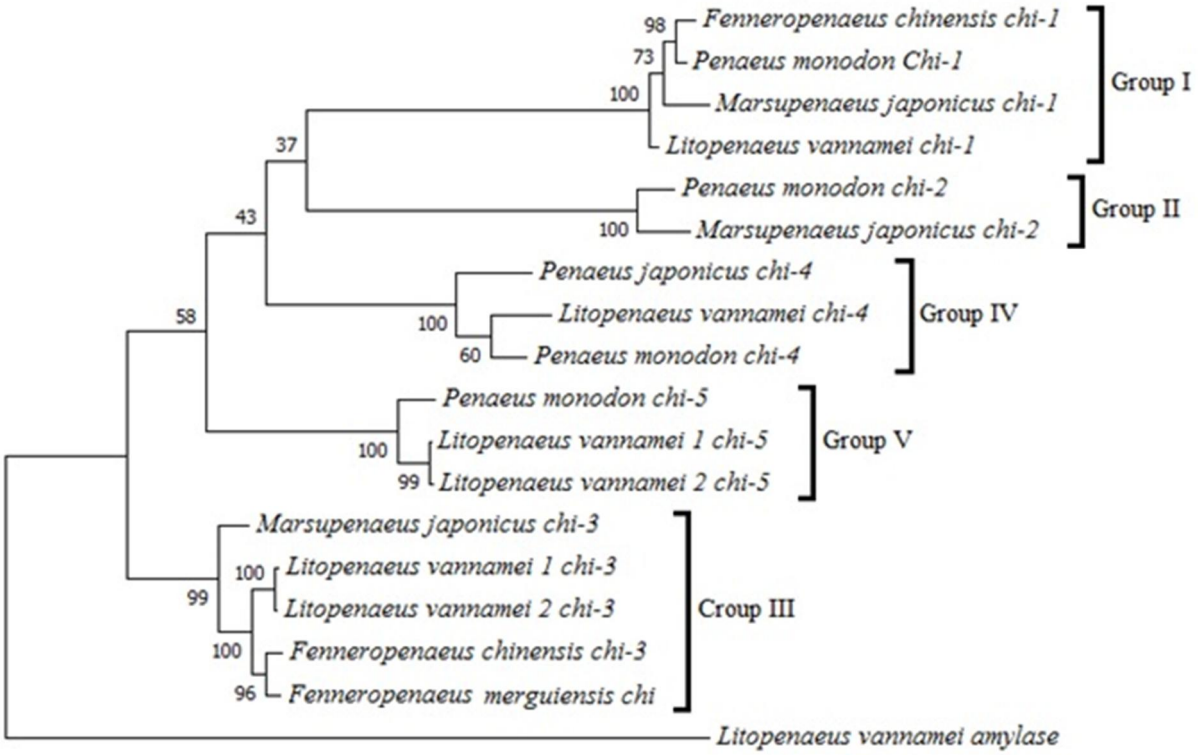
شکل 4- ساختار سه بعدی پیش بینی شده کیتیناز از *F. mergueinsis*

الف_مدل کارتونی و ب_ مدل سطحی

نتایج آنالیزهای تراز بندی توالی‌های چندگانه و فیلوژنتیکی

بررسی با نرم افزار BLAST بین رزیدوی‌های اسید آمینه کیتیناز از *F. mergueinsis* با توالی های پروتئینی نشان داد که دارای بیشترین همسانی به میزان 97,86% با *P. mondon* chi-3 (ADG22163.1)، 97,22% با کیتیناز *P. chinensis* (AAY44300)، 96,44% با کیتیناز *P. vannamei* (AAT80625) و 92,72% با *P. japonicus*

chi-3 (BAA22854) و کمترین همسانی به میزان 49,74% با کیتیناز *P. mondon* (ARM20252) و 49,28% با chi-4 *P. vannamei* (ROT67643) نشان داد. نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی آنزیم کیتیناز از *F. mergueinsis* با توالی‌های سایر میگوهای خانواده پنائیده در دسترس در بانک ژن نشان داد که *F. mergueinsis* بیشترین وابستگی با Fcchi-3 از *F. chinensis* با بوت استرپ به شدت قوی 96% دارد (شکل 5). کیتیناز از *F. mergueinsis* در کلاد مربوط به کیتینازهای گروه 3 با بوت استرپ قوی 99% حمایت شد (شکل 5).



شکل 5- درخت فیلوژنتیکی ساخته شده به روش maximum likelihood با بوت استرپ 1000 تکرار، بر اساس توالی‌های پروتئینی کیتیناز *F. mergueinsis* (این مطالعه) با توالی سایر میگوهای خانواده پنائیده ثبت شده در بانک ژن است. اطلاعات مربوط به توالی های مورد استفاده همه گونه‌ها در جدول 1 نشان داده شده است. آمیلاز *L. vannamei* (GenBank accession no. KM077135) به عنوان برون گونه می باشد.

بحث

کیتینازها دارای نقش مهمی در رشد سخت پوستان، چرخه پوست اندازی، حذف اسکلت خارجی و سنتز اسکلت خارجی جدید می‌باشند.. در مطالعه حاضر، cDNA کد کننده کیتیناز از *F. mergueinsis* جداسازی و تعیین توالی شد. سپس مورد بررسی‌های مولکولی و ساختاری قرار گرفت و روابط فیلوژنتیکی و مقایسه آن با سایر گونه‌های میگوهای متعلق به خانواده پنائیده توصیف شد. بررسی مولکولی توالی آمینواسیدی پیشگویی شده نشان داد که کیتیناز *F. mergueinsis* با 1404 bp به 467 رزیدوی اسید آمینه کد گذاری شد. وزن مولکولی توالی کیتیناز 51,84 KDa و PI تئوریکال 4,79 تخمین زده شد. نتایج نمایان کرد که کیتیناز از *F. mergueinsis* دارای بیشترین همسانی (high identities) به ترتیب به میزان 97

% با *P. mondon* chi-3 (ADG22163) و کیتیناز *P. chinensis* (AAY44300)، 49% با کیتیناز *P. mondon* (ARM20252) و *P. vannamei* chi-4 (ROT67643) می باشد. نتایج آنالیزهای فیلوژنتیکی نمایان کرد که آنزیم کیتیناز از *F. mergueinsis* بیشترین وابستگی به میزان 96% با Fcchi-3 از *F. chinensis* دارد.

مطالعات انجام شده توسط Zhou et al., 2017 بر روی کیتینازهای 4 (Pmchi-4) و 5 (Pmchi-5) از *P. mondon* نشان داد که طول کامل cDNA از Pmchi-4 دارای 2178 bp شامل 1815 bp بود که به 604 رزیدوی اسید آمینه کد گذاری شد و طول کامل cDNA از Pmchi-5 دارای سایز 2860 bp شامل 1731 bp ORF که به 576 رزیدوی آمینو اسید کدگذاری شد. وزن مولکولی Pmchi-4 و Pmchi-5 به ترتیب 67,7 KDa و 64,8 KDa پیش بینی شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان داد که Pmchi-4 دارای بیشترین همسانی به ترتیب با گونه‌های *L. vannamei* (83%)، *E. sinensis* (66%)، *P. japonica* (63%) و *M. nipponense* (61%) می باشد. آنالیزهای دمین نشان داد که Pmchi-4 دارای دو مدول متصل شونده به کیتین (chitin binding module) می باشد [11].

مطالعات مولکولی انجام شده توسط Duan et al., 2014 بر روی ژن کیتیناز میگوی *Exopalaemon carinicauda* (ridgetail white prawn) به نام EcChi نمایان کرد که طول کامل cDNA، دارای 1319 bp و 1176 bp ORF بوده که به 391 رزیدوی اسید آمینه کد گذاری شد. وزن مولکولی 43,71 KDa و نقطه ایزوالکتریک 4/78 تخمین زده شد. نتایج تحقیقات آنها بر روی آنالیز بلاست آمینو اسیدهای EcChi نمایان کرد که دارای تشابه بالایی بترتیب با کیتیناز *Pandalopsis japonica* (77%)، *Scylla serrata* (65%)، *L. vannamei* (62%)، *F. chinensis* (62%) و کیتیناز 3 *M. japonicus* (61%) می باشد. ترازبندی چندگانه توالی EcChi از *E. carinicauda* نشان داد که دارای حفاظت بالایی در جایگاه فعال (FDGLDMDWE) می باشد[17] .

مطالعات انجام شده قبلی بر روی Fcchi-3 از *F. chinensis* نشان داد که طول cDNA دارای 1616 bp، 1401 bp ORF بوده که به 467 رزیدوی آمینو اسید کدگذاری و وزن مولکولی 51/92 KDa و PI 4/73 پیش‌بینی شد. همچنین، بررسی های مولکولی نشان داد که Fcchi-3 دارای بیشترین همسانی cDNA به میزان 92% و 91,4% به ترتیب با کیتیناز گونه‌های *L. vannamei* (AAN74647) و *M. japonicus* (BAA22854) می باشد [13]. بر اساس مطالعات انجام شده بر روی هفت cDNA کد کننده کیتیناز از *L. vannamei* نتیجه شد که طول cDNA از Lvchi-1 (EU883591) با 1893 bp به 628 رزیدوی اسید آمینه، Lvchi-2 (FJ888479) با 1127 bp، Lvchi-3 (EU381118) با 1594 bp، Lvchi-4 (FJ888480) با 1690 bp، Lvchi-5 (FJ888481) با 1665 bp، Lvchi-6 (GQ916594) با 1183 bp و Lvchid-1 (GQ916595) با 592 bp کد شد [5].

در مطالعه حاضر، آنالیزهای ساختاری مربوط به توالی اسید آمینه کیتیناز *F. mergueinsis* نشان داد که دارای یک پل دی سولفیدی شکل گرفته توسط دو Cys در موقعیت 421 - 436، جایگاه فعال در موقعیت 117-125، یک جایگاه مفروض N – گلیکوزیلاسیون در موقعیت 424-427، ناحیه غنی از پرولین / ترئونین در موقعیت های 376-412، دمین کاتالیتیکی Glyco-18 در موقعیت 2-347 و یک جایگاه متصل شونده به کیتین (chitin-binding) پریتروفین A در موقعیت 403-456 می باشد. بر طبق مطالعات انجام شده توسط Niu et al., 2018 بر روی Lvchi-5 از *L. vannamei* گزارش شد که دارای 1980 bp ORF بوده که به 659 رزیدوی اسید آمینه کد گذاری شد. Lvchi-5 دارای یک دمین کاتالیتیکی Glyco-18 و یک دمین متصل شونده به کیتین نوع 2 بود [10]. در

آنالیزهای انجام شده قبلی بر روی کیتینازهای Lvchi-1، Lvchi-2 و Lvchi-3 از *L. vannamei* مشخص شد که توالی آمینو اسیدی شامل یک پپتید سیگنال، یک دمین کاتالیتیکی کیتیناز GH18، یک ناحیه غنی از سرین/ترئونین و یک مدول متصل شونده به کیتین نوع 18 می باشد. Lvchi-4 دارای دو و Lvchi-5 دارای یک مدول متصل شونده به کیتین 18 بودند [5].

نتایج مطالعات انجام شده توسط Proespraiwong et al., 2010 بر روی کیتینازهای *P. mondon* نمایان کرد که توالی آمینو اسیدی Pmchi-1 با 644 اسید آمینه و وزن مولکولی 72,4 KDa، تشابه خیلی زیادی (حدود 88-91%) با کیتیناز *M. japonicus*، *F. chinensis* و *L. vannamei* نشان داد. آنالیزهای انجام شده نشان داد که دارای یک دمین کاتالیتیکی Glyco-18 در موقعیت A20 - D371 و یک دمین متصل شونده به کیتین غنی از Cys در موقعیت I443 - M498 می باشد. توالی آمینو اسیدی Pmchi-2 با 1223 bp به 644 اسید آمینه کد گذاری شد. بررسی های مولکولی نشان داد که دارای هومولوژی خیلی بالایی (حدود 90-97%) با کیتیناز 2 از میگوهای پنائید می باشد. همچنین دارای یک دمین کاتالیتیکی Glyco-18 در موقعیت Y28 - D373 می باشد. توالی آمینو اسیدی Pmchi-3 به 468 اسید آمینه با وزن مولکولی 51/9 KDa کد گذاری شد. بررسی های مولکولی نشان داد که هومولوژی خیلی بالایی (حدود 93-97%) با کیتیناز 3 از *F. chinensis* ، *L. vannamei* و *M. japonicus* دارد. همچنین دارای یک دمین کاتالیتیکی Glyco-18 در موقعیت V1 - D348 و یک دمین متصل شونده به کیتین در موقعیت V402 به L459 می باشد [12]. بررسی های ساختاری بر روی توالی ژن Fcchi-3 نشان داد که دارای هفت اگزون با 411, 252, 186, 132, 171, 117 and 135 bp و شش اینترون با 232, 196, 121, 90, 159 and 157 bp می باشد. پیش بینی شد که Fcchi-3 دارای یک دمین کاتالیتیکی Glyco-18، یک hing region، یک پل دی سولفیدی در موقعیت 436 و 449 و یک دمین متصل شونده به کیتین نوع 2 می باشد (Zhang et al., 2010). Sarmiento et al., 2016 گزارش کردند که CDA-1 از *P. mondon* به طول 2176 bp با 1596 bp ORF بوده که به 532 اسید آمینه با وزن مولکولی 61,271 KDa کد گذاری شد. آنالیزهای انجام شده نشان داد که ژن PmCDA-1 دارای پپتید سیگنال در موقعیت‌های AA23 و 24، جایگاه های N- گلیکوزیلاسیون در موقعیت های AA236، 260 و 288، دمین متصل شونده به کیتین پریتروفین A در موقعیت‌های AA41 به AA95، گیرنده LDL کلاس A دمین در موقعیت‌های AA115 به AA149 و دمین کاتالیتیکی NodB homology می باشد [18]. دمین متصل شونده به کیتین پریتروفین A، اولین دمین محافظت شده یافت شده، در کیتینازهای موجود در ارگانیسم‌ها به‌عنوان بخشی از پروتئین‌های ماتریکس پریتروفیک یافت می‌شود [19]. این دمین در افزایش فعالیت آنزیم و امکان تعامل طولانی مدت با سوبسترا و پاسخ‌های فیزیولوژیکی نقش به‌سزایی دارد [20, 21]. گزارش شده است که دمین متصل شونده به کیتین پریتروفین A در *F. chinensis*، در افزایش فعالیت و دفاع ایمنی نقش اساسی داشته است [22]. همچنین گزارش شده است که این دمین در *P. mondon* و *L. vannamei* در تقویت تعامل بین آنزیم با سوبسترا در پاسخ به عفونت WSSV (white spot syndrome virus) نقش داشته است [23، 24]. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که کیتیناز مستخرج شده از *F. mergueinsis* جز کیتینازهای گروه 3 بوده و دارای نقش بیولوژیکی مهمی از جمله چرخه پوست اندازی، تخریب اسکلت خارجی قدیمی و سنتز اسکلت خارجی جدید می باشد. مطالعه حاضر یک تحقیق بنیادی و کاربردی برای تحقیقات بیشتر در مورد عملکرد زیستی کیتیناز در *F. mergueinsis* می باشد.

منابع

1. Martínez-Zavala, S.A., et al., *Chitinases of Bacillus thuringiensis: Phylogeny, Modular Structure, and Applied Potentials.* Frontiers in Microbiology, 2020. **10**: p. 3032.

2. Zhang, Y.H., et al., *Stimulatory effects of chitinase on growth and immune defense of orangespotted grouper (Epinephelus coioides).* Fish and Shellfish Immunology, 2012. **32**: p. 844–854.

3. Beygmoradi, A., et al., *Marine chitinolytic enzymes, a biotechnological treasure hidden in the ocean?* Applied Microbiology and Biotechnology, 2018 :102 .p. 9937–9948.

4. Samadi, S., et al., *Phylogenetic relationships of the commercial marine shrimp family Penaeidae from Persian Gulf.* Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2016. **15**(1): p. 333-346.

5. Huang, Q.S., et al., *Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in Litopenaeus vannamei.* Fish and Shellfish Immunology, 2010. **29**: p. 75–81.

6. Dahiya, N., R. Tewari, and G.S. Hoondal, *Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2 :71 .006p. 773– 782.

7. Duo-Chuan, L., *Review of fungal chitinases.* Mycopathologia 2006. **161**(6): p. 345–360.

8. Hollensteiner, J., et al., *Bacillus thuringiensis and Bacillus weihenstephanensis inhibit the growth of phytopathogenic Verticillium species* .Frontiers in Microbiology, 2017. **17**: p. 2171.

9. Martens, K., et al., *Global diversity of ostracods (Ostracoda, Crustacea) in freshwater.* Hydrobiologia 2008. **595**: p. 185-193.

10. Niu, S., et al., *A chitinase from pacific white shrimp Litopenaeus vannamei involved in immune regulation.* Developmental and Comparative Immunology, 2018. **85**: p. 161–169.

11. Zhou, K., et al., *Characterization and expression analysis of a chitinase gene (PmChi-4) from black tiger shrimp (Penaeus monodon) under pathogen infection and ambient ammonia nitrogen stress.* Fish and Shellfish Immunology, 2017. **72**: p. 117-123.

12. Proespraiwong, P., A. Tassanakajon, and V. Rimphanitchayakit, *Chitinases from the black tiger shrimp Penaeus monodon: phylogenetics, expression and activities.* Comparative Biochemistry and physiology, 2010. **156**(2): p. 86-96.

13. Zhang, J.Q., et al., *Molecular characterization and expression analysis of chitinase (Fcchi-3) from Chinese shrimp, Fenneropenaeus chinensis.* Molecular Biology Reports, 2010. **37**: p. 19131921,–

14. D., P., et al., *Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (Penaeus japonicus) by suppression subtractive hybridization.* Developmental and Comparative Immunology, 2005. **29**(2): p. 103–112.

15. Tan, S.H., B.M .Degnan, and S.A. Lehnert, *The Penaeus monodon chitinase 1 gene is differentially expressed in the hepatopancreas during the molt cycle.* marine Biotechnology NY, 2000. **2**(2): p. 126–135.

16. Watanabe, T. and M. Kono, *Isolation of a cDNA encoding a chitinase family protein from cuticular tissues of the Kuruma prawn Penaeus japonicus.* Zoological Science, 1997. **14**(1): p. 65–68.

17. Duan, Y., et al., *The responsive expression of a chitinase gene in the ridgetail white prawn Exopalaemon carinicauda against Vibrio anguillarum and WSSV challenge.* Cell Stress and Chaperones, 2014. **19**(4): p. 549–558.

18. Sarmiento, K.P., V.A. Panes, and M.D. D. Santos, *Molecular cloning and expression of chitin deacetylase 1 gene from the gills of Penaeus monodon (black tiger shrimp* .(Fish and Shellfish Immunology, 2016. **55**: p. 484-489.

19. Shen, Z. and M. Jacobs-Lorena, *A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector Anopheles gambiae binds to chitin. Cloning,*

expression, and characterization. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273** p. 17665-17670.

20. Cantarel, B.L., et al., *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics.* Nucleic Acids Research, 2009. **37** p. D233-D238.

21. Leu, J.H., et al., *A review of the major penaeid shrimp EST studies and the construction of a shrimp transcriptome database based on the ESTs from four penaeid shrimp.* Marine Biotechnology 2011. **13**: p. 608–621.

22. Du, X.J., et al., *Identification and molecular characterization of a peritrophin-like protein from fleshy prawn (Fenneropenaeus chinensis).* Molecular Immunology, 2006. **43** p. 1633-1644.

23. Chen, K.Y., et al., *Penaeus monodon chitin-binding protein (PmCBP) is involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection.* Fish and Shellfish Immunology, 2009 :(3) 27 .p. 460-465.

24. Xie, S., et al., *Envelope proteins of white spot syndrome virus (WSSV) interact with Litopenaeus vannamei peritrophin-like protein (LvPT).* PLoS One, 2015. **10** (12): p. e0144922.

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Phylogenetic and bioinformatics analysis of chitinase encoding cDNA from *Fenneropenaeus mergueinsis*

Azadeh Beygmoradi[1], Ahmad Homaei[2*], Roohullah Hemmati[3], Behnaz Saffar[4]

1- PhD Student in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran
2- Associate Professor of Biochemistry, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran. P.O. Box 3995, Tel.: +98 76 33711000-11; Fax: +98 76 33670716, E-mail address: a.homaei@hormozgan.ac.ir and a.homaei@gmail.com (A. Homaei).
3- Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
4- Associate Professor of Cellular and Molecular Biology, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 2020/12/28 Accepted: 2021/1/25

Abstract:
Chitinases are essential enzymes in crustaceans that play an important role in the molting cycle and digestion of chitin. Based on the present study, the chitinase encoding cDNA of *Fenneropenaeus mergueinsis* with a length of 1404 bp containing 467 amino acids was sequenced by RT-PCR and then its phylogenetic and bioinformatics analysis was performed. The new sequence was registered in the gene bank with the accession number MT250539 and the molecular weight of the protein resulting from this sequence was predicted to be 51.84 KDa and the theoretical isoelectric point of 4.79. Comparison of amino acid sequences among penaeid chitinases showed the highest identification (about 97 to 92%) with *P. mondon* chi-3, *F. chinensis*, *P. vannamei* and *P. japonicus* chi-3, respectively. Phylogenetic studies showed that chitinase in the present study belongs to group 3 chitinases. Revealed protein pattern analyzes showed that chitinase from *F. mergueinsis* contained the catalytic domain Glyco-18 at position 2-347, a chitin-binding site of pritrophin A at position 403-456, a disulfide bridge formed by two cysteines at position 436-421 is a chitin-binding domain type 2, active site at position 117-125 (^{11}7FDGLDMDWE^{125}), a proline / threonine-rich region at positions 376-412, and a putative N-glycosylation site at position 427-424 (NTSG). The present study shows that the *F. mergueinsis* sequence contains active chitinase motifs similar to previously sequenced chitinases, and in the case of cloning, expression and purification probably has functional and structural features similar to the enzymes of the above species.

Keywords: Chitinase; Phylogeny, Bioinformatics, CDNA; *Fenneropenaeus mergueinsis*