

11. Gleba Y, Klimyuk V, Marillonet S. Magnification — a new platform for expression vaccines in plants // *Vaccine*.— 2005.— Vol.23.— P. 2042–2048.
12. Dorokhov Y.L., Sheveleva A.A., Frolova O.Y. et al. Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves // *Tuberculosis*.— 2007.— Vol.87.— P. 218–224.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual.— Gold Spring Harbor Laboratory Press.— 1989.— 2-nd ed.
14. Chaung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analysis // *PCR Meths. Applics.*— 1993.— Vol.3.— P. 69–70.

Резюме

Розроблено серію векторів для трансформації пластоми рослин роду *Nicotiana*. Дані конструкції містять гени *esxA* та *fbpB* з мікобактерії *Mycobacterium tuberculosis*, що поєднані з селективним геном *aadA* та експресуються поліцистронно під контролем *psbA* гену. В результаті проведення трансформації пластоми *N.benthiana* отримано понад 30 стійких до антибіотику ліній, частина з яких підтверджена як трансгенні за допомогою ПЛР детекції.

Создана серия векторов для трансформации пластома растений рода *Nicotiana*. Данные конструкции содержат гены *esxA* и *fbpB* из микобактерии *Mycobacterium tuberculosis*, которые объединены с селективным геном *aadA* и экспрессируются полицистронно под контролем *psbA* гена. В результате проведения трансформации пластома *N.benthiana* получено более 30 устойчивых к антибиотику линий, часть из которых подтверждена как трансгенные при помощи ПЦР детекции.

Set of vectors has been created for plastome transformation of plants of *Nicotiana* genera. These constructs possess *esxA* and *fbpB* genes combined with selective *aadA* gene which are expressed polycistronically under control of *psbA* gene. Over 30 antibiotic resistant lines have been selected in the course of *N. benthiana* plastome transformation and a part of them have been detected as transgenic by PCR.

ВАСИЛЕНКО М.Ю., НИТОВСЬКА І.О., КУЧУК М.М., КУЧУК М.В.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: mxvasylenko@gmail.com,
maxim@iicb.kiev.ua*

ЕКСПРЕСІЯ ХИМЕРНИХ ГЕНІВ *fbpB::gfp* ТА *fbpB(ΔTMD)::gfp* В РОСЛИНАХ *NICOTIANA TABACUM* ТА *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Сучасні методи біотехнології дають змогу використовувати вищі рослини як біореактори для напрацювання гетерологічних білків (антитіл, антигенів, гормонів) з цінними фармацевтичними властивостями. Одним з напрямків щодо створення вакцин нового покоління лежить можливість генетично змінених рослин продукувати імуногенні білки збудників інфекційних хвороб. Так, вперше імуногенність антигену, який синтезували в рослинах, була показана в 1992 році на прикладі трансгенних рослин тютюну, що експресували білок туберкуліну.

пресували поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) [1]. На сьогодні вже показано експресію понад 50 антигенів людини та тварин в різноманітних рослинних видах, серед яких: тютюн, *N. benthamiana*, картопля, салат, шпинат, томати, кукурудза, арабідопсис [2–5]. До того ж на основі трансгенних рослин активно розробляється концепція “їстівних вакцин”. Як показано в ряді робіт, рослини, що вживаються в їжу і водночас експресують певний антиген, можуть викликати вироблення мукозного імунітету при контакті з стінками кишечника у людей та тварин [6–8].

В нашій лабораторії проводяться дослідження щодо експресії туберкульозних антигенів ESAT6 та Ag85B, що відповідно кодується генами *esxA* та *fbpB* з *Mycobacterium tuberculosis*. З літератури відомо, що данні білки мають високу імуногенність і є головними кандидатами в експериментах зі створення рекомбінантної вакцини — альтернативи до існуючої вакцини проти туберкульозу (БЦЖ, Bacille de Calmette et de Guerin). Використовуючи різні підходи, в своїх дослідженнях ми намагаємось створити рослини з високими рівнями експресії туберкульозних антигенів. Для цього проводяться експерименти з транзійтної експресії антигенів, трансформації пластома, ядерного геному із використанням послідовностей транзитних пептидів для компартаментації і накопичення кінцевого продукту. Метою даної роботи є отримання об’єднаної послідовності антигену із маркерним геном *gfp* для візуалізації експресії цільового білку.

Матеріали і методи

Створення генетичних конструкцій, що містять рекомбінантні послідовності *fbpB::gfp* та *fbpB(ΔTMD)::gfp*, проводили в три етапи: по-перше, синтезували кодуючу послідовність гену *gfp* за допомогою ПЛР на матриці вже існуючого вектору, але використовували при цьому праймери із модифікованими кінцевими послідовностями, що визначають сайти для гідролізу рестриктазами *EheI* та *XbaI*, проводили гідроліз ПЛР-продукту названими рестриктазами, виділяли та очищали отриманий фрагмент ДНК; по-друге, проводили гідроліз вектору, що містив ген *fbpB* або його вкорочену версію *fbpB(ΔTMD)*, за допомогою рестриктаз *EheI* та *XbaI*, виділяли та очищали отриманий фрагмент вектору; по-третє, проводили лігування вектору та ПЛР-фрагменту, після якого проводили трансформацію бактерій (*E. coli* та *A. tumefaciens*), відбирали штами з коректно зібраним вектором.

Генетичну трансформацію *N. tabacum* та *N. benthamiana* проводили за допомогою агробактерій штаму GV3101 із створеними векторами, що містять химерні послідовності *fbpB::gfp* та *fbpB(ΔTMD)::gfp*. Для отримання стабільних трансгенних ліній проводили трансформацію методом “листових дисків” [10] із подальшою регенерацією на селективних середовищах (10 мг/л фосфінотрицину). Транзійтну експресію проводили в тепличних рослинах *N. benthamiana* методом інфільтрації суспензії агробактерії в листову пластину [11]. Через 5–7 діб після інфільтрації ті сегменти листової пластини, що контактували із суспензією агробактерії, досліджували під мікроскопом а також екстрагували загальний білок.

Стабільно трансформовані лінії *N. tabacum* та *N. benthamiana* перевіряли за допомогою ПЛР при цьому використовували праймери специфічні до селективного гену *nptII*, цільового гену *fbpV* та зшитого з ним гену *gfp*. ПЛР здійснювали за умовами стандартної програми: 94 °C — 2 хв., (94 °C — 30 сек., 58–65 °C — 30 сек., 72 °C — 30–60 сек.), 72 °C — 2 хв., де температура гібридизації праймеру та час синтезу фрагменту варіювали в залежності типу праймерів та розміру фрагменту, що аналізувався.

Екстрагування препаратів загального білка трансформованих рослин проводили в двократному буфері для нанесення зразків (200 мМ Трис-НСІ рН 8.8, 4% ДСН, 400 мМ 2-МЕ, 40% гліцерин, 0,01% бромфенолової синій) при цьому препарати не прогрівали. Розділення білків екстракту проводили в 12% ПААГ в трис-гліцинової буферній системі.

Цитологічні дослідження проводили за допомогою мікроскопу Ахіорhot-35 із застосуванням фільтрів з каналами детекції 405 нм (DAPI), 488 нм (GFP), 543 нм (хлорофіл). Також використовували УФ-лампу для візуалізації флуоресценції GFP в зонах транз'єнтної експресії в листках рослин та в ПААГ при розділенні загального білку інфільтрованих рослин.

Результати та обговорення

В результаті клонування послідовності гену *gfp* із заданими сайтами рестрикції в вектори pCB065 та pCB068 було отримано дві нові векторні конструкції, в яких ген *gfp* було розташовано в одній рамці читання разом із генами *fbpV* та *fbpV*(Δ TMD), відповідно. Такі векторні конструкції використовували для трансформації *N. tabacum* та *N. benthamiana*. Агробактеріальну трансформацію здійснювали методом ко-культивування листових експлантів з відповідною лінією агробактерії, після чого проводили елімінацію бактерії з подальшою селекцією стійких до фосфінотрицину пагонів, які утворювалися на регенераційних середовищах. Таким чином було відібрано по 20–30 незалежно утворених пагонів для кожного виду, які далі вкорінювали на живильному середовищі також з додаванням селективного агента в концентрації 10 мг/л. Для підтвердження трансгенної природи вкорінених ліній проводили ПЛР-детекцію трансгенів (*bar*, *fbpV*, *gfp*) в ДНК зразках. Серед аналізованих ліній понад 80% було таких, що мали позитивний сигнал по трьох ділянках Т-ДНК. Проте аналіз трансгенних ліній за допомогою ультрафіолетового опромінення не виявив характерної для GFP флуоресценції, що може бути викликано наднизьким рівнем експресії химерного білка Ag85B-GFP, можливо внаслідок процесу сайленсінгу, або в наслідок неправильного формування флуорофору в молекулі GFP за умов з'єднання його з туберкульозним антигеном Ag85B чи Ag85B(Δ TMD).

Також нами було проведено серію експериментів з тимчасової експресії створених химерних конструкцій в клітинах *N. benthamiana*. Як позитивний контроль в даних дослідах ми використали вектор з геном *gfp*, що знаходиться так само під контролем 35S промотора як і в тестових векторах. Через 5–7 діб після інфільтрації агробактерії, коли експресія GFP в контрольних ділянках листків була максимальною, детекція флуоресценції проводилась

і в експериментальних ділянках листків. За попередніми даними мікроскопічного дослідження флуоресценції GFP було виявлено ознаки концентрації химерного продукту Ag85B(Δ TMD)::GFP в клітинних стінках клітин епідермального шару листка, а також дифузне накопичення в цитоплазмі мезофільних клітин, інколи асоційоване з хлоропластами. Порівнюючи інтенсивність флуоресценції підчас експресії контрольного гену (GFP) та химерного (Ag85B::GFP), можна зазначити, що яскравість для експериментальних зразків була значно (в кілька разів) нижча за контроль. Це, звичайно, може свідчити про нижчий рівень накопичення в клітині саме химерного білка проти вільного GFP, що в свою чергу може бути обумовлено якимось негативним впливом антигену на рослину клітину.

Тимчасову експресію рекомбінантного білка також досліджували за допомогою розділення білкової фракції в поліакриламідному гелі (ПААГ) з подальшою детекцією при УФ опроміненні. Білкові екстракти, зроблені з інфільтрованих ділянок листя, наносили в ПААГ і розділяли в м'яких денатуруючих умовах, після чого в гелі при опроміненні УФ-світлом спостерігали смуги характерної зеленої флуоресценції GFP, які відповідали вільному GFP (30 кДа) та химерному продукту Ag85B(Δ TMD)::GFP (>50кДа). Експериментальні зразки також мали в кілька разів менш яскраву флуоресценцію в порівнянні зі смугами контрольного GFP. Отримані дані вказують, що за умов швидкої транзійтної експресії вдається детектувати більші рівні накопичення рекомбінантного білка. Цей факт можливо обумовлений тим, що процеси сайленсінгу, притаманні рослинній клітині підчас експресії чужорідної генетичної інформації, не встигають досягти рівнів, достатніх для блокування трансгенів.

Висновки

Отже, в процесі виконання даної роботи було створено вектори для трансформації рослин, які містять химерні послідовності генів *fbpB::gfp* та *fbpB(Δ TMD)::gfp*. Поєднання туберкульозного антигену Ag85B та його варіанту Ag85B(Δ TMD) з маркерним білком GFP дало змогу виявити експресію деяких кількостей цільового білку в клітинах *N.benthamiana* за умов транзійтної експресії, частково локалізувати місця його накопичення та порівняти із експресією власне GFP. Також отримано ряд стабільно трансформованих ліній *N.tabacum* та *N.benthamiana*, методом ПЛІР-детекції доведено присутність трансгенів в даних лініях. Проведена робота є частиною великого дослідження щодо експресії та накопичення туберкульозних антигенів в рослинних клітинах, результати цієї роботи мають бути продовжені і розвинуті в наступних дослідженнях для з'ясування можливостей ефективної продукції антигенів в рослинних системах.

Література

1. *Mason H.S., Lam D.M.K., Arntzen C.J.* Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 11745–11749.
2. *Yusibov V., Hooper D., Spitsin S. et al.* Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine // Vaccine. — 2002. — Vol. 20. — P. 3155–3164.

3. Chikwamba R.K., Scott M.P., Meja L.B. et al. Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2003.— Vol.100.— P. 11127–11132.
4. Rigano M.M., Alvarez M.L., Pinkhasov J. et al. Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic Escherichia coli heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in Arabidopsis thaliana // Plant Cell Rep. 2004.— Vol.22.— P. 502–508.
5. Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V. et al. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: Development of recombinant vaccine // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2005.— Vol.102.— P. 9062–9067.
6. Tacket C.O., Mason H.S., Lososky G. et al. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes // J. Infect. Dis.— 2000.— Vol.182.— P. 302–305.
7. Thanavala Y., Mahoney M., Pal S. et al. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2005.— Vol.102.— P. 3378–3382.
8. Warzecha H., Mason H.S., Lane C. et al. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato // J. Virol.— 2003.— Vol.77.— P. 8702–8711.
9. Rigano M.M., Dreitz S., Kipnis A.-P. et al. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine // Vaccine.— 2006.— Vol.24.— P. 691–695.
10. Ian S. Curtis, Michael R. Davey, J. Brian Power. Leaf Disk Transformation // Methods in Molecular Biology.— 1995.— Vol.44.— P. 59–70.
11. Gleba Y, Klimyuk V, Marillonet S (2005) Magnification — a new platform for expression vaccines in plants // Vaccine.— 2005.— Vol.23.— P. 2042–2048.

Резюме

Створено дві векторні конструкції для агробактеріальної трансформації рослин, які містять химерні послідовності генів *fbpB* та *fbpB*(Δ TMD) туберкульозної мікобактерії, поєднаних з маркерним геном *gfp*. Проведено генетичну трансформацію *N.tabacum* та *N.benthamiana* за допомогою агробактерії, в наслідок якої отримано ряд стабільних трансгенних ліній. Також детектовано транзйентну експресію химерного білку Ag85B(Δ TMD)::GFP в інфільтрованих листах *N.benthamiana*, яку частково охарактеризовано за допомогою цитологічних та біохімічних методів.

Создано две векторные конструкции для агробактериальной трансформации растений, которые содержат последовательности генов *fbpB* и *fbpB*(Δ TMD) туберкулезной микобактерии, соединенных с маркерным геном *gfp*. Проведена генетическая трансформация *N.tabacum* та *N.benthamiana* при помощи агробактерии, в результате которой получено ряд стабильных трансгенных линий. Также детектирована транзйентная экспрессия химерного белка Ag85B(Δ TMD)::GFP в инфильтрированных листьях *N.benthamiana*, которую частично охарактеризовали при помощи цитологических и биохимических методов.

Two vector constructs have been created for agrobacterial transformation. Vectors are possessed chimerical sequences of *fbpB* and *fbpB*(Δ TMD) genes which fused with marker *gfp* gene. Genetic transformation of *N.tabacum* and *N.benthamiana* has been performed by agrobacterium-mediated method. Stable transgenic lines were selected and transient expression of chimerical Ag85B(Δ TMD)::GFP protein was observed and partially characterized by cytological and biochemical methods.

**ВОЛЧОК Н.М., МИХАЙЛОВА М.Е., БЕЛАЯ Е.В., КАМЫШ Н.А.,
ТИХАНОВИЧ Н.И., МЕДВЕДЕВА Ю.В.**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
Республика Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27,
e-mail: natavolchok@yandex.ru*

(–1689) ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АЛЬФА-ЛАКТАЛЬБУМИНА (α -LA) И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПРИЗНАКАМИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРС

Известно, что количество белков в молоке и их структура имеют большое экономическое значение для перерабатывающей промышленности и в значительной степени определяют количество и технологические свойства молока. Одним из таких биологически значимых протеинов является многофункциональный белок — α -лактальбумин (α -LA), входящий в состав молочной сыворотки, наличие которого является важным признаком качества молока, характеризующим его полезные свойства.

α -LA — небольшой глобулярный протеин, состоящий из 123 аминокислот и имеющий молекулярную массу 14 кД, играет важную роль в биосинтезе лактозы. При участии эпителиальных клеток молочной железы, α -LA в комплексе с галактозилтрансферазой участвует в формировании фермента лактозсинтазы, который, в свою очередь, синтезирует лактозу в аппарате Гольджи, а лактоза, затем, в комплексе с α -LA секретируется в молоко. Содержание α -LA и лактозы в коровьем молоке составляет около 1,5 г/л, что соответствует 5%. Лактоза, содержащаяся в секреторных везикулах эпителиальных клеток молочных желез, создает внутри клетки повышенное осмотическое давление, благодаря которому внутрь везикул поступает вода. Таким образом, повышение концентрации α -LA, являющегося ключевым регулятором синтеза лактозы, вызывает пропорциональное увеличение выхода молока [1].

Ген, кодирующий бычий α -лактальбумин (α -LA), локализован у КРС в 5 хромосоме и состоит из 2023 п.н., включая 4 экзона и 3 интрона. α -LA характеризуется наличием нескольких полиморфных вариантов: в позициях +15, +21, +54 [2] и –1689 [3], относительно точки старта транскрипции 5' фланкирующего региона. Вариабельность в этом регионе может приводить к различной способности связывания РНК-полимеразы и факторов транскрипции, участвующих в регуляции экспрессии гена. Теоретически, замены в последовательности генетических регуляторных элементов в данном участке могут изменять степень экспрессии мРНК, кодируемой этим геном [1].

Данные полиморфизмы являются следствием точковых мутаций, в частности в позиции –1689, замена аденина на гуанин приводит к образованию двух аллельных вариантов гена. Аденин в этой позиции был обозначен как А-аллель, а гуанин — как В-аллель [2, 3]. Lundén А. с соавт. была показана взаимосвязь между (–1689) полиморфизмом и концентрацией лактозы