

10. *Лакин Г.Ф.* Биометрия.— М.: Высш. шк., 1990.— 352 с.
11. *Hsu C.S., Ho Y.C., Wang K.C., Hu Y.C.* Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells // *Biotechnol. Bioeng.*— 2004.— 88, N1.— P. 42–51.
12. *Hesse D, Sellebjerg F, Sorensen PS.* Absence of MxA induction by interferon beta in patients with MS reflects complete loss of bioactivity // *Neurology.*— 2009.— V.73.— P. 372–377.

### **Резюме**

Сконструирован рекомбинантный бакуловирусный вектор Ac-IFN-GFP, содержащий репортерный GFP под регуляцией промотора CMV и ген мышечного  $\beta$ -*Irfn* под регуляцией кассеты CAG. Показано значительное уменьшение эффективности трансдукции Ac-IFN-GFP по сравнению с контрольным вектором в клеточных линиях HEK293, MM4 и C57Fb.

Сконструирований рекомбинантний бакуловирусний вектор Ac-IFN-GFP, що містить репортерний GFP під регуляцією промотору CMV і ген мишачого  $\beta$ -*Irfn* під регуляцією касети CAG. Показано значне зменшення ефективності трансдукції Ac-IFN-GFP у порівнянні з контрольним вектором в клітинних лініях HEK293, MM4 и C57Fb.

Recombinant baculovirus vector Ac-IFN-GFP with GFP reporter gene under the CMV promoter and mouse  $\beta$ -*Irfn* gene controlled by CAG promoter cassette has been constructed. Significant decrease in transduction efficiency of Ac-IFN-GFP compared to control Ac-CMV-GFP in three cell lines HEK293, MM4 and C57Fb was demonstrated.

## **ВАСИЛЕНКО М.Ю., КУЧУК М.М., ОВЧАРЕНКО О.О., КУЧУК М.В.**

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

### **ОТРИМАННЯ ТРАНСПЛАСТОМНИХ РОСЛИН *NICOTIANA BENTHAMIANA* ІЗ ГЕНАМИ МІКОБАКТЕРІЇ *(MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS)***

Рослини як об'єкт сучасних генно-інженерних досліджень все частіше привертають до себе увагу дослідників і стають дедалі більш поширеними в біотехнологічних розробках, конкуруючи з класичними об'єктами біотехнологій — бактеріями, дріжджами, культурами клітин тварин та людини. Спочатку за участю рослин розроблялись сучасні методи для вирішення традиційних селекційно-генетичних проблем підвищення продуктивності сільськогосподарських рослин та їх захисту від різноманітних біотичних та абіотичних стресових факторів. Проте зараз набуває популярності другий напрямок, названий “молекулярним виробництвом” (molecular farming), що спеціалізується на отриманні та використанні трансгенних рослин як біореакторів, що продукують цінні для промисловості та медицини органічні сполуки. За останні двадцять років велику кількість цінних білків було

продуковано в рослинах. Це білки людської сироватки, регулятори росту, антитіла, вакцини, промислові ферменти, біополімери та реагенти для молекулярної біології [1–5]. Рослинні системи мають перспективи успішного використання для виробництва рекомбінантних білків в промислових масштабах, вони є економічно привабливими в умовах масштабного виробництва. Недорогі умови вирощування культури-продуцента позитивно впливатимуть на вартість кінцевого продукту в порівнянні з таким, що вироблено в культурах тваринних клітин та людини. Окрім цього еукаріотичні рослинні клітини є кращою альтернативою до бактерій-продуцентів, оскільки в багатьох випадках цільові білки є саме еукаріотичного походження (переважна їх більшість людського походження), і вони потребують додаткових посттрансляційних модифікацій.

Одним з шляхів досягнення ефективної продукції рекомбінантних білків в рослинах-продуцентах є створення трансгенних рослин із генетично модифікованим пластомом — транспластомних рослин. Такі рослини мають ряд переваг в порівнянні із рослинами з трансформованим ядерним геномом. По-перше, за даними з літературних джерел [6, 7] рівень експресії трансгенів в транспластомних рослинах може сягати значно вищих показників в порівнянні з ядерно-трансформованими рослинами, що зумовлено, як вважають, високою копійністю пластоми, а відтак і вбудованого трансгену. По-друге, трансформуючи пластом, можна створювати більш складні генетичні конструкції, що несуть кілька генів, оскільки для геному пластид властивий поліцистронний тип експресії. По-третє, транспластомні рослини є більш біологічно безпечними через материнський тип успадкування пластоми, властивий для переважної більшості вищих рослин. До того ж можна додати, що у транспластомних рослин ще досі не було показано явищ метилування трансгенів, які призводили б до припинення їх експресії, як це відбувається в ядерному геномі.

Отже, зважаючи на наведені переваги транспластомних рослин як продуцентів цінних білків, ми вирішили створити транспластомні рослини *Nicotiana benthamiana* із генами *esxA* та *fbpB*, що мають походження від збудника туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*) і кодують секреторні білки мікобактерії: ESAT6 та Ag85B. Дані білки є об'єктом досліджень при розробці нової протитуберкульозної вакцини, тому можливість накопичення даних білків є важливою. Окрім цього рослини-продуценти таких антигенів можуть бути застосовані не тільки для накопичення очищеного білкового препарату, а й використовуватись як "їстівна вакцина". Підчас споживання такої рослини імунна відповідь виникатиме при контакті синтезованого в тканинах рослини антигену із слизовими оболонками шлунково-кишкового тракту піддослідної тварини [8–10].

Вибір *N.benthamiana* для проведення пластомної трансформації був обумовлений спорідненістю даного виду з класичним модельним об'єктом — *N.tabacum*, який є дуже ефективним і традиційно використовується в експериментах з генетичної трансформації. Також *N.benthamiana* є дуже ефектив-

ним продуцентом рекомбінантного білку у разі використання системи тимчасової експресії, що базується на використанні вірусомісних векторів [11, 12]. Створення транспластомних рослин *N.benthamiana* дасть можливість порівняти ефективність різних експресійних систем в межах одного виду.

### Матеріали і методи

Для створення пластом-трансформуючих векторів використовували генетичні конструкції, які були люб'язно надані проф. Н.-У. Коор (Інститут Ботаніки, Мюнхенський Університет, ФРН) та проф. Дороховим Ю.Л. (Інститут фізико-хімічної біології ім. А.Н. Білозерського, МГУ ім. М.В. Ломоносова, Росія). Вихідний вектор для пластомної трансформації містив селективний ген *aadA* (аміноглікозид-3'-аденілінтрансферази) та ген *gusA* ( $\beta$ -глюкуронідази), які розташовані в межах гомологічних тютюновому пластоми ділянок *psbA* та *trnH-rpl2* генів. Замість маркерного гену *gusA* клонували відповідні гени мікобактерії *esxA*, *fbpB* та об'єднану послідовність *esxA::fbpB*. Клонування та інші супутні процедури проводили за протоколами, описаними в Sambrook et al. [13]. Для інтегрування генів мікобактерії в базову векторну конструкцію використовували спейсерні послідовності *rps19/rpl22*, *psaA/B* та сайт зв'язування з рибосомами (RBS) тютюнового пластоми (рис. 1А). Створені таким чином векторні конструкції перевіряли за допомогою секвенування відповідних ділянок.

Пластомну трансформацію *N.benthamiana* проводили за методом білістичної трансформації за допомогою створених векторних конструкцій. Препарат плазмідної ДНК готували, використовуючи колонки QIAGEN Plasmid Maxi Kit. ДНК векторів абсорбували на вольфрамових часточках

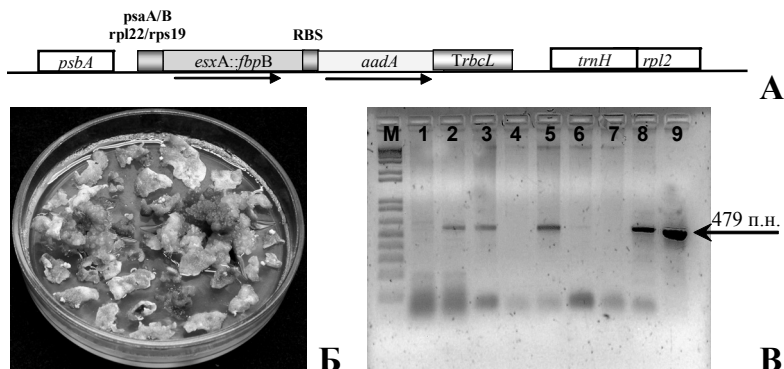


Рис. 1. (А) Схема розташування генів в векторі для трансформації пластоми, де *psbA* та *trnH-rpl2* — ділянки гомології з пластомом, *esxA::fbpB* — варіант рекомбінантного цільового гену, *aadA* — селективний ген, *TrbcL* — термінатор гену великої субодиниці рибулозо-1,5-бісфосфат-карбоксилази *rbcL*; (Б) Регенерація стійких до селективного антибіотику клітинних ліній; (В) ПЛР-аналіз спектиноміцин-стійких рослин з використанням праймерів, специфічних до гену *aadA*, де 1 — негативний контроль, 2-8 — відібрані для аналізу лінії, 9 — позитивний контроль, М — ДНК маркер

(M-5 Microcarriers, 0,4  $\mu\text{m}$ , BioRad) шляхом послідовного додавання до 50 мкл суспензії часточок (0,06 мг/мл в 50% гліцеролі) 10 мкл плазмідної ДНК (1 мкг/мкл) та 10 мкл розчину PEG/MgCl<sub>2</sub> (50% PEG 2000, 5 М MgCl<sub>2</sub>). Після інкубації протягом 20 хв. при кімнатній температурі часточки збирали центрифугуванням та ре-суспендували в 60 мкл абсолютного етилового спирту. Листки асептичних рослин викладали нижнім боком догори на чашки Петрі із живильним середовищем (MS з 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК), які встановлювали на відстані 14 см від решітки з нанесеними вольфрамовими часточками з адсорбованою плазмідною ДНК для обстрілу. Перед пострілом тиск в камері гармати зменшували до 0,05 атмосфери. Для трансформації кожним типом вектору брали щонайменше 10 чашок Петрі з рослинним матеріалом. Через три дні листки нарізали на експланти, які культивували на живильному середовищі (MS з 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК) з додаванням спектиноміцину (200–400 мг/л). Кожні 3–4 тижні проводили пасажі на свіжі живильні середовища з селективним антибіотиком. Стійкі до селекції пагони, що утворювались на експлантах чи калюсах, пересаджували на середовище для вкорінення, що також містило селективний антибіотик.

Для проведення молекулярно-біологічного аналізу з відібраними лініями стійких рослин готували препарати загальної рослинної ДНК за Chaung et al. [14]. 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.

### Результати та обговорення

Клонуючи послідовності генів секреторних білків ESAT6 та Ag85B, ми використовували лінкernі послідовності міжгенних спейсерів *rps19/rpl22*, *psaA/B* та RBS, які створювали шляхом ре-асоціації відповідних олігонуклеотидів. Спроектвані на кінцях олігонуклеотидів сайти, що пізнаються певними ендонуклеазами рестрикції, дозволили проводити лігування трьох фрагментів одночасно в запланованій орієнтації: спейсер I — ген — спейсер II. Створені таким чином варіанти вихідного вектору забезпечили гомологічну рекомбінацію з пластомом та поліцистронну експресію трансгенів *esxA*, *fbpB*, *esxA::fbpB*, *aadA*, що знаходяться під контролем гену *psbA*.

Власне трансформацію здійснювали методом бомбардування листових експлантів *N.benthamiana* мікрочастинками вольфраму з нанесеною на них ДНК вектору. Селекцію трансформованих клітин проводили на регенераційних середовищах за допомогою спектиноміцину (рис. 1Б), після чого сформовані пагони вкорінювали на середовищі для коренеутворення також з додаванням спектиноміцину. Із зразками ДНК рослин, які було регенеровано на селективному середовищі, було проведено молекулярно-біологічний аналіз за допомогою ПЛР із використанням праймерів, специфічних до селективного *aadA* гену та цільових генів *esxA* та *fbpB*. Один з результатів ПЛР-аналізу наведено на рис. 1В, при ампліфікації зразків ДНК деяких відібраних ліній (доріжки 2, 3, 5, 8) утворюється фрагмент ДНК очікуваної довжини — 479 п.н.

Цікавим залишається факт відсутності ПЛР-фрагменту для частини стійких ліній *N.benthamiana*, який ми схильні пояснювати тривалою сегрегацією трансформованих і нетрансформованих пластомів в межах однієї лінії, що як наслідок може мати повернення деяких ліній до дикого генотипу. Трансгенні рослини *N.benthamiana*, що мають інтегровані в пластом гени мікобактерії разом із селективним геном, будуть в подальшому досліджені відносно рівнів накопичення цільового продукту та його біологічної активності в імунологічних тестах.

### **Висновки**

За результатами даної роботи можна зазначити, що конструкції, створені на основі вектору для пластомної трансформації тютюну, також ефективно можуть інтегруватись в пластом споріднених видів, зокрема *N.benthamiana*. Отже, має місце певна універсальність гомологічних послідовностей, використаних під час створення векторів.

Використовуючи створені векторні конструкції, отримано спектиноміцин-стійкі транспластомні рослини *N.benthamiana* з послідовностями генів *M.tuberculosis* (*esxA* та *fbpB*), які проаналізовано за допомогою ПЛР.

### **Література**

1. Barta A., Sommergruber K., Thompson D. et al. The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue // Plant Mol. Biol.— 1986.— Vol.6.— P. 347–357.
2. Chong, D.K.X., Roberts W., Arakawa T. et al. Expression of the human milk protein b-casein in transgenic potato plants // Transgenic Res.— 1997.— Vol.6.— P. 289–296.
3. Hood E.E., Witcher D.R., Maddock S. et al. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification // Mol. Breeding.— 1997.— Vol.3.— P. 291–306.
4. Merle C., Perret S., Lacour T. et al. Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant // FEBS Lett.— 2002.— Vol.515.— P. 114–118.
5. Scheller J., Henggeler D., Viviani A., Conrad U. Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation // Transgenic Res.— 2004.— Vol.13.— P. 51–57.
6. Staub J.M. Garcia B., Graves J. et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts // Nat. Biotechnol.— 2000.— Vol.18.— P. 333–338.
7. Tuboly T., Yu W., Bailey S. et al. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants // Vaccine.— 2000.— Vol.18.— P. 2023–2028.
8. Mason H.S., T.A. Haq, J.D. Clements and C.J. Arntzen. Edible Vaccine Protects Mice Against *E. coli* Heat-labile Enterotoxin (LT): Potatoes Expressing a Synthetic LT-B Gene // Vaccine.— 1998.— Vol.16.— P. 1336–1343.
9. Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G., Estes M.K., Levine M.M. and Arntzen C.J. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes // J. Infect. Dis.— 2000.— Vol.182.— P. 302–305.
10. Richter L.J., Y. Thanavala, C.J. Arntzen and H.S. Mason. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization // Nat. Biotechnol.— 2000.— Vol.18.— P. 1167–1171.

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 тютюнової мозаїки.