



УДК 576.3.312:32

ЯДЕРНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ *NICOTIANA TABACUM* НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ МЕМБРАННОГО ПРОТЕИНА *BRUCELLA ABORTUS* OMP 16.

А.А. Чистякова

Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Астана

Данная работа была проведена в лаборатории «Молекулярной биологии и биотехнологии растений» Дармштадского технологического университета (Германия), под непосредственным руководством моего научного консультанта профессора Дармштадского технологического университета, руководителя лаборатории – Prof. Dr. Dr. ch. Heribert Warzecha.

Введение

За последние несколько лет в ведущих научно-исследовательских центрах мира созданы трансгенные растения продуценты широкого спектра гормонов, цитокинов, факторов роста и ферментов, имеющих потенциальное применение в фармакологии. Все они не уступают по биологической активности аналогам, получаемым в фармакологической промышленности традиционными способами [1].

Растения как «фабрики» для продукции чужеродных иммуногенных белков – «растительные (съедобные) вакцины» – имеют ряд преимуществ по сравнению с клетками бактерий, дрожжей и млекопитающих. Так, например, клетки растений не содержат патогенных для человека вирусов и прионов. Наработка целевых вакцинных белков в растениях не требует применения дорогостоящей аппаратуры, культуральных сред и системы стерильности. Стоимость выращивания исходных опытных растений несравнимо ниже стоимости культивирования клеток бактерий, дрожжей или животных. Таким образом, стоимость иммуногенных белков, выделяемых из растений, в 10-30 раз ниже, чем при культивировании трансформированных бактерий [2].

В настоящее время уже получены и изучаются «съедобные вакцины» против вирусов бешенства, ящура, ВГВ и других

патогенных организмов. Исследования проводятся на основе трансгенных растений картофеля, салата, кукурузы, шпината, люцерны и др.

В качестве объектов нашего исследования были выбраны растение *Nicotiana tabacum* и патогенная бактерия *Brucella abortus*. При выборе растения мы руководствовались тем, что оно должно было быть легко возделываемым как в лабораторных, так и в полевых условиях, а также должно быть организмом, хорошо изученным с молекулярно-генетической точки зрения. Это условие необходимо для успешного проведения с ним всего комплекса генно-инженерных манипуляций.

Другой объект нашего исследования – грамотрицательная бактерия *Brucella abortus*, возбудитель бруцеллеза людей и животных – был выбран по нескольким причинам, главная из которых та, что до сих пор не найдено вакцины, которая бы полностью предохраняла от заболевания привитых ею людей и животных [3]. В силу сложности антигенной структуры возбудителя, разнообразия и изменчивости его антигенных свойств, а также высокой вирулентности, вакцинные средства, приготовленные из него по традиционной технологии, не безопасны для человека и при вакцинации могут провоцировать развитие инфекционного процесса. Практическое использование таких вакцинных средств приводило в большинстве случаев к



развитию вялотекущей бруцеллезной инфекции с разнообразными осложнениями аллергенного характера. В связи с этим, задача нахождения альтернативных вариантов эффективной и безопасной вакцины против бруцеллеза, способной решить проблему защиты человека и животных от патогенного возбудителя, остается актуальной.

В данной работе описано проведенное на базе лаборатории «Молекулярной биологии и биотехнологии растений», технологического университета г. Дармштадт (Германия) исследование по изучению ядерной трансформации *Nicotiana tabacum* нуклеотидной последовательностью мембранного иммуногенного белка *Brucella abortus* Omp16. Среди способов генетической трансформации растений наиболее эффективным и надежным считается введение чужеродных генов, с помощью *Agrobacterium tumefaciens*. При этом чужеродные гены, как правило, стабильно интегрируются и передаются от поколения к поколению согласно законам Менделя [4]. Данный метод основан на природной способности *Agrobacterium tumefaciens* проникать в ядро растительной клетки и встраивать свою ДНК в геном клетки-хозяина. Благодаря этому появляется реальная возможность модификации ядерного генома в соответствии с целями и задачами экспериментатора.

Но здесь могут возникать некоторые трудности. Очень часто экспрессионные системы, идеальные для экспрессии одного гена, оказываются совершенно непригодными для экспрессии другого. Кроме того, гиперпродуктивность некоторых генов может приводить к гибели растения, так как синтезируемый белок в большом количестве приобретает токсичные свойства. Поэтому все спорные моменты требовалось выяснить в ходе предстоящего исследования.

Таким образом, целью нашего эксперимента являлась апробация молекулярного вектора pPSI, сконструированного на основе T-области Ti-плазмиды *Agrobac-*

terium tumefaciens, предназначенного для осуществления процесса ядерной трансформации *Nicotiana tabacum*, и получения рекомбинантной ядерной ДНК, стабильно экспрессирующей целевой иммуногенный мембранный белок *Brucella abortus* Omp16.

Материалы и методы

В работе были использованы бактериальные штаммы *Escherichia coli* TOP10 и *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, а также растения табака *Nicotiana tabacum*, которые высаживали в виде семян непосредственно на питательную агаризованную MS-среду, и выращивали в течение 4-8 недель при дневной (ночной) температуре +22°C (+16°C), а также 16-часовом освещении мощностью 6000 люкс в стерильных условиях.

В качестве полноценной жидкой и твердой (1,5% агар) среды для размножения бактериальных культур использовали LB-среду, в которую добавляли следующие антибиотики: канамицин (Kan) - 100 мг/л, рифампицин (Rif) - 100 мг/л и гентамицин (Gent) - 100 мг/л. Для образования каллуса использовали твердую (1,5% агар) RMOP-среду, в которую добавляли канамицин (Kan) - 100 мг/л и тикацелин (Tic) - 100 мг/л (для подавления роста агробактерий). MS-среду без добавления антибиотиков использовали для выращивания из семян целого растения *Nicotiana tabacum* в стерильных условиях [5].

Используемая в работе нуклеотидная последовательность мембранного иммуногенного протеина *Brucella abortus* Omp16 была предоставлена нам в виде вектора pO16 1421 (на основе вектора PCR-Blunt) доктором Juliana Cassataro, работающей в лаборатории иммуногенетики города Буэнос-Айрес, Аргентина. В предоставленном материале нуклеотидная последовательность Omp16 синтезирована в соответствии с таковой, представленной в банке данных - Gene bank accession number L 27996.1 - и доработана тем, что на С-терминальном конце содержит



6 триплетов, кодирующих аминокислоту гистидин (His-tag). Количество аминокислот в белке – 152, вес – 21 килодальтон (кДа), длина – 500 пар нуклеотидов (пн). Иммунные свойства белка, кодируемого этой последовательностью, были апробированы на мышах в вышеупомянутой лаборатории, в результате чего была подтверждена иммуногенность синтезированного протеина Omp16.

Для осуществления процесса ядерной трансформации *Nicotiana tabacum*, был использован молекулярный вектор pPSI (рис. 1), любезно предоставленный профессором Dr.Ralf Kaldenhoff, лаборатория иммуногенетики Дармштадского технологического университета (Германия).

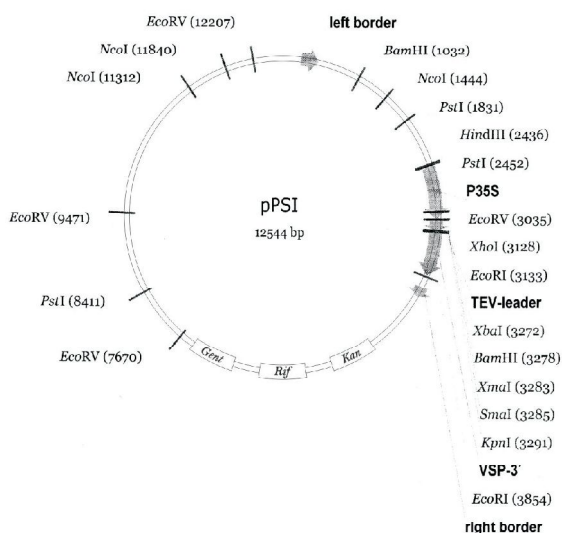


Рис. 1. Векторная карта pPSI

Реакционная смесь для амплификации гена Omp16 содержала: 1 мкл вектора pO16 1421 (10 mM раствор), 2 мкл дНТФ (10 mM раствор), по 2 мкл праймеров PO16 104 и PO19 204 (10 mM раствор) и 1 мкл Taq ДНК-полимеразы (2,5 ед.). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в течение 35 циклов (денатурация 1 мин при 94°C, отжиг 40 с при 62°C, синтез 1 мин при 72°C) в амплификаторе “T-Gradient Thermocycler” (“Biometra GmbH”, Германия). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,0% агарозном геле и окрашивали бромистым этидием. В качестве маркера длины фрагмента ДНК

при электрофоретическом разделении векторных фрагментов использовали ДНК фага λ , обработанного ферментом AvaII. Клонлируемые в клеточных культурах *Escherichia coli* TOP10 вектора очищали по методу Birnboim & Doly [6].

ПЦР-продукт амплификации гена Omp16 (Eluat), а также вектор pPSI были подвержены ферментативному расщеплению рестриктазами по следующей схеме:

1 этап: 6 мкл – Miniprep pPSI (Eluat); 2 мкл – Tango Puffer; 1 мкл – XbaI; 1 мкл – H₂O. Полученную смесь инкубировали в течение часа в термостате при температуре +37°C, затем на 20 минут на водяной бане при температуре +65°C.

2 этап: в эту смесь добавили 6 мкл – H₂O; 2 мкл – буфер-KpnI; 1 мкл – KpnI; 1 мкл – РНКза. Полученную новую смесь инкубировали в термостате в течение часа при температуре +37°C. Затем фрагменты рестрикции разделяли при помощи геле-электрофореза, и необходимые участки элюировали из геля при помощи Nucleo Spin Extract II Kit (США) [7].

Продукты рестрикции: фрагмент ДНК, несущий информацию о строении иммуногенного протеина Omp16, и линиаризированный вектор pPSI, были сшиты по комплиментарным «липким концам». Реакцию осуществляли под контролем фермента T-4 лигазы: 6 мкл – Eluat (KpnI, XbaI); 2 мкл – pPSI (KpnI, XbaI); 1 мкл – лигаза-буфер; 1 мкл – T-4 лигаза. Смесь инкубировалась не менее часа при комнатной температуре [6].

Для трансформации культуры компетентных клеток *Escherichia coli* TOP10 продуктами лигирования (pO16 7132), на 1-1,5 мкл плазмидного материала использовали 50 мкл компетентных клеток *E. coli*, хранящихся в морозильной камере при -80°C. После добавления плазмид клетки погружали на 20 минут в лед, затем переносили на 1 минуту на водяную баню, нагретую до +42°C (тепловой шок). Затем к культуре клеток добавляли 500 мкл LB-среды без антибиотиков, и оставляли в течение часа для инкубации в термошейкере при температуре +37°C.



После этого содержимое высевали на 2 чашки Петри с агаризованной LB-средой, в которой содержался антибиотик канамицин (Kan) -100 мг/л. После высевания культуры производили её селективное выращивание в течение суток при температуре +37°C в

термошкафу. Для проведения ПЦР применяли праймеры (таблица 1), содержащие в своей нуклеотидной последовательности сайты узнавания рестрикционных эндонуклеаз KpnI и XbaI.

Таблица 1

Праймеры РО 16 104 и РО 19 204, используемые для амплификации нуклеотидной последовательности целевого протеина Omp16

Праймер	Нуклеотидная последовательность	Фирма-производитель	Специализация
PO 16 104	5'GTTTCTAGAATGGCGTCAAAGAAGAACCTTCCGAAT3'	Metabion (Германия)	Амплификация С-терминального конца Omp16
PO 19 204	5'TTAGGTACCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGA GC3'	Operon (Германия)	Амплификация N-терминального конца Omp16

После проведения ПЦР положительные бактериальные трансформанты переводили на период инкубации в жидкую питательную LB-среду, содержащую канамицин (Kan) -100 мг/л. Процесс инкубации происходил в термошейкере, при температуре +37°C, в течение суток.

Процесс трансформации агробактерий осуществляли по аналогичной схеме: на 50 мкл плазмидного материала использовали 100 мкл культуры компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, хранящихся в морозильной камере на -80°C. После добавления плазмидного материала клетки *Agrobacterium tumefaciens* погружали на 5 минут в лед, затем на 5 минут в жидкий азот, и сразу же на 5 минут на водяную баню, нагретую до температуры +42°C. Затем к культуре клеток добавляли 500 мкл LB-среды без растворенных в ней антибиотиков, и оставляли на 2 часа в термошейкере при температуре +28°C. После этого содержимое высевали на агаризованную LB-среду, в которой содержались антибиотики: рифампицин (Rif) - 100 мг/л, гентамицин (Gent) - 100 мг/л и канамицин (Kan) - 100 мг/л. После высевания клеточной культуры производили её селективный отбор в течение 3 дней при температуре +28°C. Выросшие коло-

нии *A.tumefaciens* – положительные трансформанты – предварительно тестировали при помощи ПЦР, а затем инкубировали в 50 мл жидкой LB-среды, содержащей антибиотика: рифампицин (Rif) - 100 мг/л, гентамицин (Gent) – 100 мг/л и канамицин (Kan) - 100 мг/л. Процесс осуществляли с использованием термошейкера, при температуре +28°C и колебаниях 220 rpm (об/мин) в течение 2 суток. На вторые сутки 10 мл культуры центрифугировали в течение 15 минут на скорости 8 000 g. Выпавший клеточный осадок разводили в 10 мл LB-среды без добавления антибиотиков [8].

Для проведения процесса ядерной трансформации отбирали растения *Nicotiana tabacum*, с листочками длиной не менее 2 см. Затем в стерильных условиях ламинар-бокса их срезали и трансформировали. Для этого листовые пластинки разрезали на кусочки 0,5х0,5 см, и на 5-10 минут инкубировали в агробактериальной суспензии, которую систематически перемешивали. Для повышения вирулентности агробактерий в суспензию добавляли экстракт стерильных растений табака, который был приготовлен из 500 мг растительной массы табака, гомогенизированной в 5 мл жидкой LB-среды. Гомогенат центрифугировали и супернатант добавляли в суспензию бакте-



рий в соотношении 1:3. Затем листовые диски, слегка подсушенные на фильтровальной бумаге, переносили на чашки Петри с RMOP-средой без добавления антибиотиков, и раскладывали по её поверхности проксимальной стороной вниз. Затем чашки Петри переносили в тёмное место, где экспланты культивировали в течение 2-х дней. После этого листовые экспланты переносили на RMOP-среду с канамицином (Kan) - 100 мг/л (для селективного отбора трансформированного каллуса) и тикацелином (Tic) – 100 мг/л (для подавления роста агробактерий). Каллус культивировали до начала его дифференциации на среде с тикацелином 100 мг/л в течение 6 недель. Развивающиеся растения-регенеранты пересаживали на свежую питательную RMOP-среду, содержащую 100 мг/л канамицина (Kan). Для укоренения развивающиеся побеги пересаживали на MS-среду без гормонов и витаминов с половинной концентрацией солей и 10 г/л сахарозы. Укоренившиеся трансгенные растения выращивали при температуре 26°C, 16-часовом фотопериоде [9].

Для определения продуктивности экспрессии целевого белка срывали листовые пластинки трансгенного растения (100 мг), листовую ткань гомогенизировали в жидком азоте, и экстрагировали из неё белки в 50 mM Трис-НСl, pH 8,0 (w:v=1:1) в течение 30 минут на льду. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000 g в течение 20 минут.

Количество белка Omp16 в очищенном экстракте определяли при помощи Western Blot с пробами-стандартами, где количеством белка Omp16 строго установлено, и BSA Protein Assay Kit (BCA). При этом также использовали установку TECAN infinite M200 (Германия) для определения адсорбции протеина при длине волны 595 нм, а также программу Excel (Microsoft), для обработки полученных измерений, необходимых для построения калибровочной кривой [10].

Результаты и их обсуждение

Для получения целевой нуклеотидной последовательности Omp16, с целью дальнейшей вставки её в вектор pPSI, использовалось 9 различных Mini-препаратов (рис. 2) вектора pO16 1421 (на основе вектора PCR-Blunt).

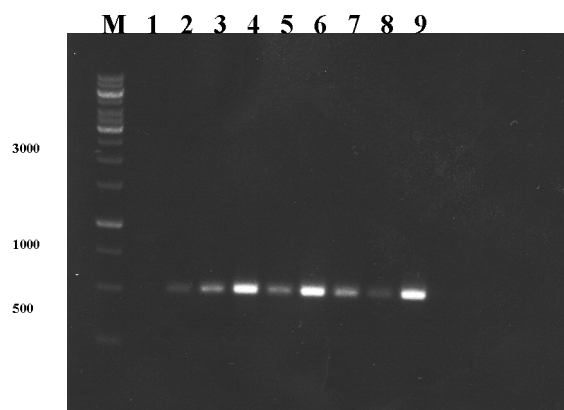


Рис. 2. Электрофорез в 1% агарозном геле продуктов амплификации Mini-препаратов вектора pO16 1421

М – маркерные ДНК-фрагменты, размеры которых указаны слева в нуклеотидах; 1-9 – продукты ПЦР-амплификации с использованием ДНК-полимеразы Tag, и праймеров PO16104 и PO19204. Дорожки на 500 нуклеотидов соответствуют целевой нуклеотидной последовательности Omp16 (500 пн), встроенной в вектор pO16 1421. Для проведения предстоящего лигирования были выбраны дорожки №4 и №6 (обозначены стрелками). Выбранные продукты амплификации изолировались из геля с помощью Nucleo Spin Extract II Kit, в результате чего был получен очищенный препарат нуклеотидной последовательности Omp16 (Eluat)

Чтобы получить вектор pPSI для вставки целевой нуклеотидной последовательности Omp16, плазида pPSI HPV_{III} (14044 пн) разрезалась по сайтам KpnI и XbaI соответствующими эндонуклеазами. При этом вес ненужного фрагмента HPV_{III} должен был составлять приблизительно 1500 пн (рис. 3).

После проведения рестрикции фрагменты pPSI (KpnI и XbaI) и Eluat нуклеотидной последовательности Omp16 были лигированы T4-лигазой в течение часа. Ожидаемая конструкция вектора pO16 7132 представлена на рисунке 4.

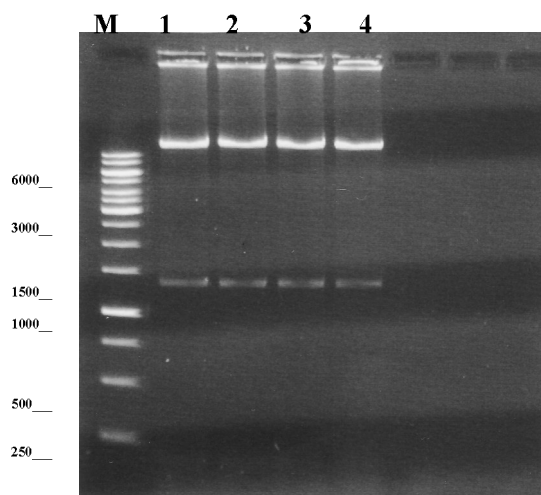


Рис. 3. Электрофорез в 1% агарозном геле продуктов рестрикции плазмиды pPSI HPV_{III} (14044 пн) эндонуклеазами KpnI и XbaI

М – маркерные ДНК-фрагменты, размеры которых указаны слева в нуклеотидах; 1-4 – продукты рестрикции вектора pPSI HPV_{III}. Дорожки на 1500 нуклеотидов соответствуют ожидаемой массе нуклеотидной последовательности фрагмента HPV_{III}. Дорожки на 12544 пн соответствуют массе вектора pPSI, находящегося в данный момент в линиаризированном состоянии. Для проведения лигирования были элюированы из геля фрагменты рестрикции под номерами №1 и №4, указанные стрелками.

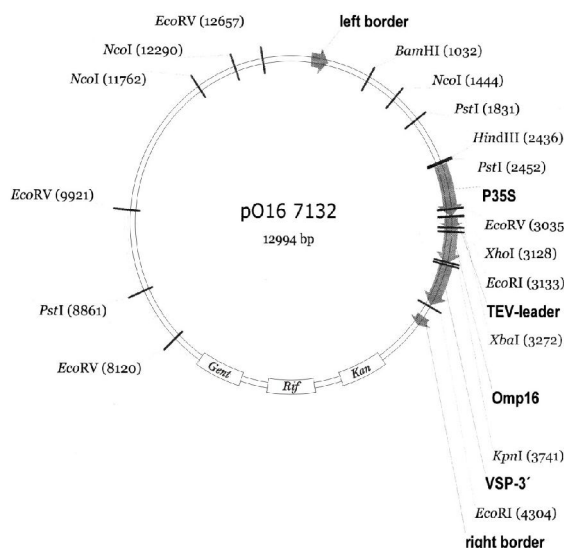


Рис. 4. Векторная карта pO16 7132

Затем продуктами лигирования был трансформирован бактериальный штамм *Escherichia coli* TOP10, который позднее тестировался ПЦР-реакцией с использованием праймеров PO16 104 и PO19 204 (рис. 5).

Выросшие на агаризованной питательной среде с добавлением канамицина в качестве фактора селекции колонии *E. coli* могли воспринять резистентность к антибиотику только благодаря наличию трансформации вектором pO16 7132. Значит, процесс лигирования прошел успешно. Теперь клонированный в *E. coli* вектор pO16 7132 мог быть использован для трансформации агробактерий.

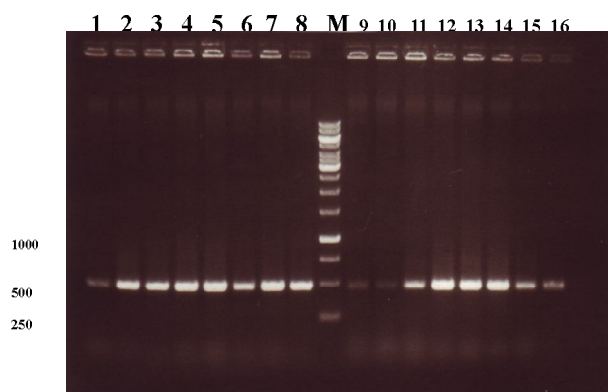


Рис. 5. Электрофорез в 1% агарозном геле продуктов ПЦР-амплификации трансформированных клонов *E. coli* с праймерами PO16 104 и PO19 204

М – маркерные ДНК-фрагменты, размеры которых указаны слева в нуклеотидах; 1-16 – продукты ПЦР-амплификации с использованием ДНК-полимеразы Tag. Дорожки на 500 нуклеотидов соответствуют массе целевой нуклеотидной последовательности Omp16, встроенной в вектор pO16 7132. Для проведения трансформации *A. tumefaciens* были отобраны колонии *E. coli* №5 и №12 (указаны стрелками).

При проведении ПЦР с трансформированными компетентными клетками *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (рис. 6) использовались те же праймеры, что и при проведении ПЦР трансформированных колоний *E. coli*.

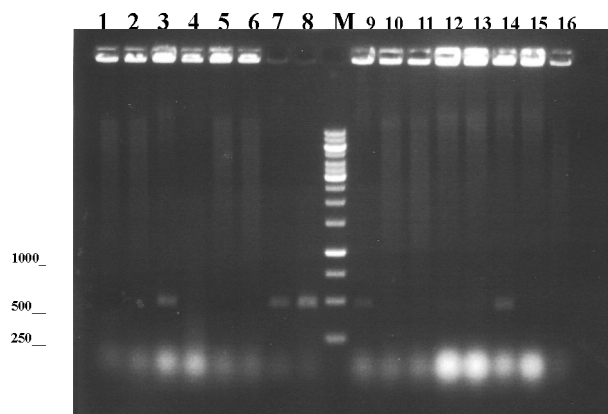


Рис. 6. Электрофорез в 1% агарозном геле продуктов ПЦР-амплификации с праймерами PO16 104 и PO19 204 трансформированных вектором pO16 7132 клонов *A.tumefaciens*

М – маркерные ДНК-фрагменты, размеры которых указаны слева в нуклеотидах; 1-16 – продукты ПЦР-амплификации с использованием ДНК-полимеразы Tag. Дорожки на 500 нуклеотидов соответствуют целевой нуклеотидной последовательности *Omp16*, встроенной в вектор pO16 7132. Для осуществления дальнейшей трансформации растений *Nicotiana tabacum* были отобраны колонии *A.tumefaciens* №3, №7, №8 и №13 (указаны стрелками)

Как свидетельствуют результаты ПЦР-анализа, нами были получены генетически модифицированные колонии *A.tumefaciens*, несущие вектор pO16 7132 и предназначенные для проведения трансформации растительных клеток *Nicotiana tabacum*.

Агробактериальная инфильтрация листовых эксплантов *Nicotiana tabacum* вектором pO16 7132 была произведена при помощи их культивирования в агробактериальной суспензии, содержащей экстракт листьев табака, для усиления процесса агробактериальной инфильтрации [12]. Затем контрольные и инфицированные экспланты *Nicotiana tabacum* поддерживались как стерильная культура на агаризованной RMOP-среде с добавлением канамицина и тикацелина при 23°C и 16-часовом периоде освещения мощностью 6000 люкс.

Через 8 недель растения-регенеранты были проанализированы на наличие экспрессии целевого протеина. Результаты

Western Blot-гибридизации представлены на рисунке 8.

Проведенные тесты показали наличие в тканях растения желаемого белка, что свидетельствовало об успешном прохождении процесса экспрессии *Omp16* в цитозоли растительных клеток *Nicotiana tabacum*. Значит, процесс ядерной трансформации мембранного иммуногенного белка *Brucella abortus Omp16* в растительной клетке – возможен.

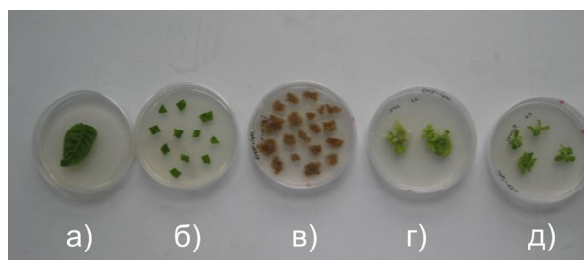


Рис. 7. Последовательные этапы развития трансгенного каллуса из листового экспланта *Nicotiana tabacum*

Обозначения: а) лист *Nicotiana tabacum*; б) листовые экспланты; в) 2-недельные листовые экспланты с зарождающимся трансгенным каллусом; г) начало дифференциации трансгенного каллуса; д) 8-недельные растения-регенеранты.

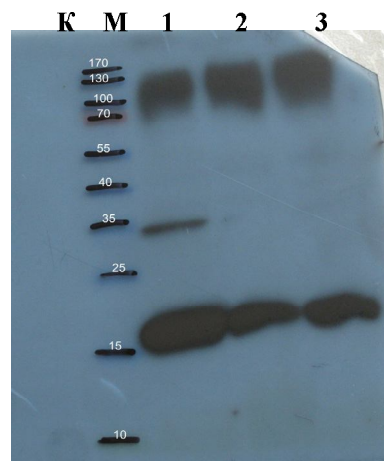


Рис. 8. Результаты Western Blot-гибридизации на определение экспрессии целевого протеина *Omp16* в трансгенном растении-регенеранте *Nicotiana tabacum*

Для определения экспрессии белка *Omp16* были использованы 8-недельные растения-регенеранты *Nicotiana tabacum*. К – контрольное, не инфицированное растение; М – маркерные белки, размеры которых указаны в кДа; 1-3 – пробы от произвольно выбранных растений *Nicotiana tabacum* спустя 8 недель после их агробактериальной



инфильтрации вектором pO167132. Дорожки на 21кДа, принадлежащие 1-3 пробам, указывают на экспрессию в *Nicotiana tabacum* целевого белка Omp16.

Для определения продуктивности экспрессии целевого протеина Omp16 в растениях-регенерантах применялся Western Blot. Изымался листовой материал от произвольно выбранных растений. Для

этого, вначале, из листового материала был выделен общий белковый экстракт, который затем при помощи БСА был протестирован, произведена его количественная оценка. Результаты проведенного измерения представлены в таблице 2 и графике 1, построенном на основании полученных табличных данных, с помощью компьютерной обработки.

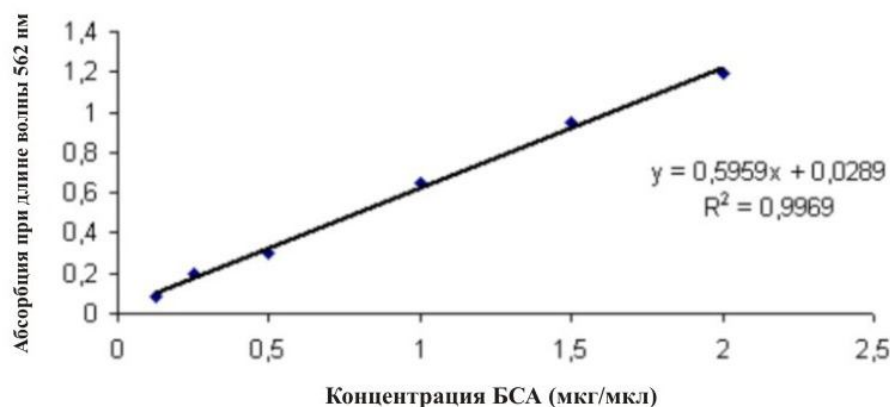
Таблица 2

**Определение общей концентрации протеина в листовом экстракте
Nicotiana tabacum при помощи БСА-проб**

Абсорбция при длине волны 562нм	Концентрация БСА (мкг/мкл)						Omp16 01:20
	0,125	0,25	0,5	1	1,5	2	
1. измерение	0,087	0,1728	0,3217	0,5402	0,9032	1,1953	0,749
2. измерение	0,0826	0,2098	0,2848	0,6319	1,0396	1,046	0,7497
3. измерение	0,0833	0,2127	0,3092	0,7603	0,9089	1,3438	
Среднее значение	0,0843	0,1984	0,305	0,6441	0,9497	1,195	0,794

График 1

**Калибровочная кривая зависимости концентрации протеина
от его абсорбционной способности при длине волны 562нм**



Концентрация белка Omp16	1:20	0,4752мкг/мкл	неразведенная	9,505 мкг/мкл
--------------------------	------	---------------	---------------	---------------

Теперь, зная общую концентрацию протеина в клетке, можно при помощи Western Blot определить процентное содержание целевого протеина Omp16 в

общем количестве растворимого протеина клетки. Для этого были использованы стандарты – пробы с уже установленным количеством целевого белка.

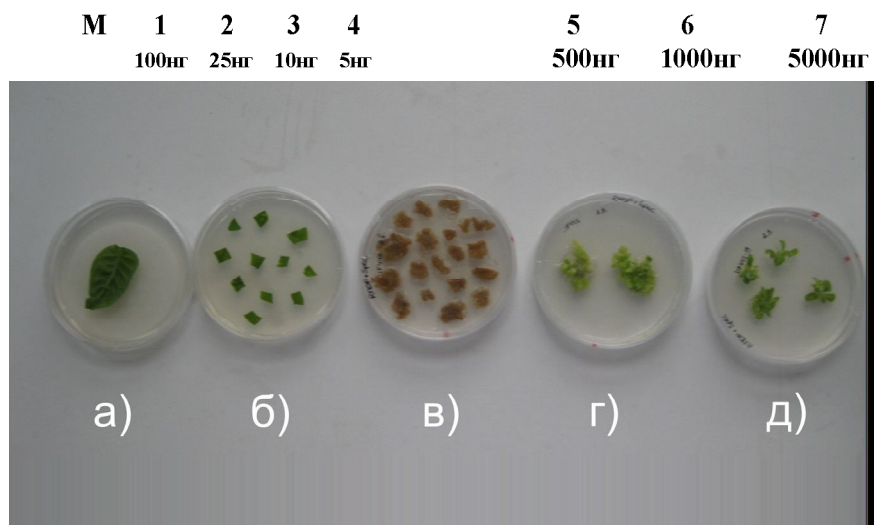


Рис. 9. Определение концентрации протеина Omp16 в растворимой белковой части содержимого клеток *Nicotiana tabacum*.

М – маркерные белки, размеры которых указаны в кДа; 1-4 – стандарты, с концентрацией целевого протеина в пробах рассчитанной, соответственно, для 100; 25; 10; 5 нг Omp16 в каждой из проб; 5-7 – тестируемые пробы с известным количеством общего растворенного протеина, соответствующим 5000; 1000; 500 нг общего растворимого протеина клетки в каждой из проб. Визуально можно проследить, что дорожка стандарта на 25 нг соответствует по интенсивности окрашивания пробе №7.

Принимая во внимание полученные после проведения Western Blot данные, свидетельствующие о том, что в 5000 нг общей растворимой белковой части 25 нг составляет Omp16, несложно рассчитать процентное соотношение целевого протеина ко всему растворимому белку клетки. Таким образом было установлено, что экспрессия целевого иммуногенного протеина *Brucella abortus* Omp16 в растениях *Nicotiana tabacum*, трансформированных вектором pO16 7132, составляет примерно 0,5% от всей части производимого в клетке растворимого белка.

В связи с этим следует отметить, что хотя идея внедрения экзогенной ДНК в растительный геном для наработки целевых продуктов и представляется весьма перспективной, но не лишена некоторых недостатков. Один из них, как следует из нашего исследования, сравнительно низкий уровень экспрессии перенесенных генов, остающийся таковым даже при использовании очень сильных промоторов. Причиной этому, по-видимому, является увеличение скорости деградации мРНК чужеродного гена, когда её уровень

достигает порогового значения. Данный механизм, возможно, служит одним из способов защиты растения от РНК-содержащих вирусов. Другой вероятной причиной низкого уровня продуктивности может оказаться протеолиз чужеродных белков в цитоплазме растительной клетки. Возможные пути выхода из сложившейся ситуации могут лежать, предположим, во введении в полипептидную цепь целевого белка сигнальных последовательностей, направляющих его накопление в апопласт или в запасную ткань семян, где частота протеолиза значительно ниже, что позволило бы существенно повысить продуктивность трансгенных растений.

В дальнейшем используемые в опыте растения-регенеранты были переведены на MS-среду с канамицином, для стимуляции процесса корнеобразования. После полной регенерации растения-трансформанты переводились на MS-среду без добавления антибиотиков, и находились в таком состоянии до окончания вегетационного периода. Семена полученных генетически модифицированных растений собирались и высевались на агаризованную MS-среду, не



содержащую антибиотиков, для получения каждого последующего поколения трансгенных растений *Nicotiana tabacum*.

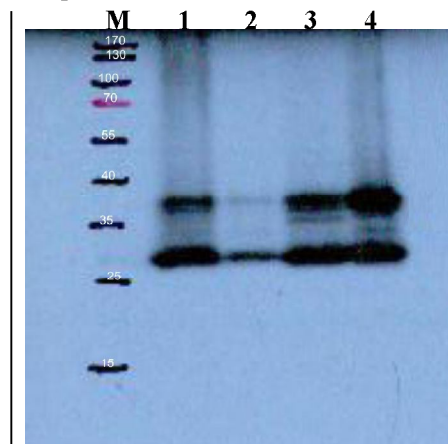


Рис. 10. Результаты Western Blot-гибридизации на определение экспрессии целевого протеина Omp16 в трансгенном растении *Nicotiana tabacum* первого поколения

Для определения экспрессии белка Omp16 были использованы 10-недельные трансгенные растения *Nicotiana tabacum* первого поколения. Обозначения: М – маркерные белки, размеры которых указаны в кДа; 1-4 – пробы от произвольно выбранных растений. Двойные дорожки, принадлежащие 1-4 пробам, указывают на экспрессию в *Nicotiana tabacum* целевого белка Omp16 (моно-и димер).

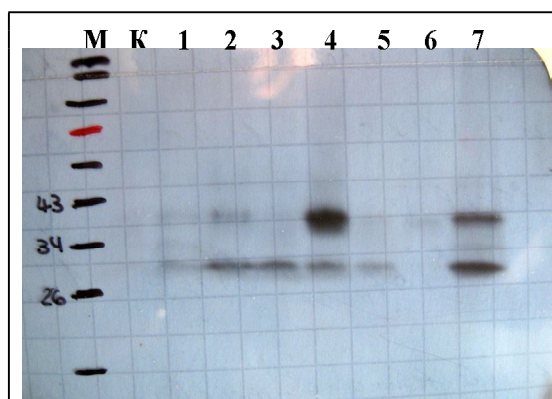


Рис. 11. Результаты Western Blot-гибридизации на определение экспрессии целевого протеина Omp16 в трансгенном растении *Nicotiana tabacum* третьего поколения

Для определения экспрессии белка Omp16 были использованы 10-недельные трансгенные растения *Nicotiana tabacum* третьего поколения. Обозначения: М – маркерные белки, размеры которых указаны в кДа; К – контрольное, не трансгенное растение *Nicotiana tabacum*; 1-6 – пробы от произвольно выбранных трансгенных растений; 7 – проба с очищенным протеином Omp16. Двойные дорожки, принадлежащие 1-6 пробам, указывают на

экспрессию в *Nicotiana tabacum* целевого белка Omp16 (моно-и димер).

Спустя 4 и 12 месяцев после начала эксперимента, т.е. у 1-го и 3-го поколений трансгенных растений, была произведена проверка экспрессии встроенного гена по средствам Western Blot-гибридизации. Преследовалась цель выявления возможных изменений в характере экспрессии, её интенсивности.

Как видно из приведенных результатов Western Blot-гибридизации, первое поколение трансгенных растений продуцирует большее количество трансгенного белка, чем их потомки третьего поколения. Слабые дорожки 1-й и 5-й проб (рис. 11) свидетельствуют о резком ослаблении, а 6-я о полном прекращении экспрессии целевого протеина, в то время как все пробы первого поколения (рис. 10) показывали наличие интенсивной экспрессии Omp16.

Здесь мы стали свидетелями зависимости эффективности экспрессии целевого гена, встроенного в геном *Nicotiana tabacum* в процессе ядерной трансформации, от срока его культивирования. Так, у первичных трансформантов табака по сравнению с растениями, полученными приблизительно после года культивирования, наблюдалось снижение содержания целевого белка во всех линиях трансформантов. Данная особенность описывается в научной литературе как явление «замолкания» трансгенов (сайленсинг). Вероятность сайленсинга резко возрастает при встраивании множества копий чужеродного гена в геном растения [11]. Поэтому при создании трансгенных растений-биопродукторов рекомбинантных белков необходимо следить за тем, чтобы происходил отбор только таких линий, которые содержат одну вставку чужеродного гена. Еще один из возможных вариантов это разработка способов вегетативного размножения генетически модифицированных растений.



Заключение

Таким образом, в данной работе нам удалось осуществить все стадии процесса ядерной трансформации *Nicotiana tabacum* при помощи вектора рО167132, сконструированного на основе рPSI, и производство иммуногенного белка Omp16 в цитозоле растительной клетки *Nicotiana tabacum*. Полученные результаты представляют большой интерес для дальнейшей разработки и совершенствования технологий ядерной трансформации и экспрессии иммуногенных протеинов в растениях. Несмотря на то, что данная

методика обеспечивает сравнительно невысокий процент выхода целевого протеина (на порядок ниже, чем, например, при транзientной экспрессии), она обладает целым рядом преимуществ, позволяющих находить новые подходы к созданию более эффективных способов производства иммуногенных белков в растении. Так, например, ядерная трансформация является ступенькой для понимания механизмов хлоропластной трансформации – новейшего направления научных исследований, открывающем огромные перспективы в области биотехнологии вакцин.

Литература

1. Giddings G., Allison G., Brooks D., Carte A. Transgenic plants as factors for biopharmaceuticals // Nature Biotechnol. 2000. V. 18. - P. 1151-1155.
2. Walmsley A., Arntzen C. Plants for delivery of edible vaccines // Current Opinion in Biotechnol. 2000. - V. 11. - P. 126-129.
3. Luo D., B. Ni, P. Li, W. Shi, S. Zhang, Y. Han, L. Mao, Y. He, Y. Wu and X. Wang // Protective Immunity Elicited by a Divalent DNA Vaccine Encoding Both the L7/L12 and Omp16 Genes of *Brucella abortus* in BALB/c Mice // Infect. Immun. 2006 74(5): 2734-2741.
4. Hansen G., Chilton M.D. Agrolistic Transformation of Plant Cell: Integration of T-Strans Generated in Planta // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. - V. 93. - P. 14978-14983.
5. Tang, X., Y. Nakata, H.-O. Li, M. Zhang, H. Gao, A. Fujita, O. Sakatsume, T. Ohta and K. Yokoyama // The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E.coli* and *A.tumefaciens* // Nucl. Acids Res. 1994. 22(14): 2857-2858.
6. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Springer Harbor: Cold Springer Harbor Lab., 1982. - 545 p.
7. Birnboim, H. C. and J. Doly // A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucleic Acids Res. 1979 7(6): 1513-23
8. Zupan, J. R. and P. Zambryski. Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell. Plant Physiol. 1995. 107(4): 1041-7.
9. Draper J., Scott R., Armitage P., Walden R. Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual. Oxford: Blackwell Sci., 1998. - 408 p.
10. Cramer C., Boothe J., Oishi K. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream technologies // Current Topics in Microbiol. and Immunol. 1999. - V. 240. - P. 95-118.
11. T.A. Brown. Gentechnologie für Einsteiger // Spektrum. Akademischer Verlag. München. - 2007. - 5.Auflage.

Түйін

Omp16 *Brucella abortus* иммундік белоктың нуклеотидты тізбекпен *Nicotiana tabacum* ядролық өзгеру процессі жүзеге асырылды. Бұл үшін Omp16 біртұтас иммуногендік ақуызының нуклеотидтік тізбегі бар рО167132 бинарлық өсімдік векторы пайдаланылды, және ол *Nicotiana tabacum* жасушаларын агробактериялық инфильтрациялауға арналған. өсімдіктердегі мақсатты протеиннің экспрессиясының (>1% жиынтық белоктан) жоғары деңгейі оның негізінде вакциналық препараттарды ары қарай әзірлеу үшін осы тәсілді пайдалану тиімділігі туралы бізге қорытынды жасауға мүмкіндік берді.



Резюме

Осуществлен процесс ядерной трансформации *Nicotiana tabacum* нуклеотидной последовательностью иммуногенного белка *Brucella abortus* Omp16. Для этого был использован растительный бинарный вектор – pO167132, несущий нуклеотидную последовательность целевого иммуногенного белка Omp16, и предназначенный для агробактериальной трансформации клеток *Nicotiana tabacum*. Относительно высокий уровень экспрессии целевого протеина в растениях (>0,1% от суммарного белка) позволил нам сделать вывод об эффективности применения данной методики для дальнейшей разработки на ее основе вакцинных препаратов.

Summary

The process of nuclear transformation of *Nicotiana tabacum* nucleare is carried out by sequence of immunogenic protein, Omp16 allocated from *Brucella abortus*. The vegetative binary vector - pO167132, bearing nucleare sequence of target immunogenic albumen Omp16, intended for agrobacterial transformation of *Nicotiana tabacum* cells has been used for this purpose. A relatively high level of the expression of a target protein in plants (> 0,1% from total protein,) has allowed us to draw a conclusion about efficiency of application of the given technique for further elaboration of vaccinal preparations on its basis.