



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 576.8.093.1:615.371:582.951.4

**ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ПРОЦЕССА ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ
МЕМБРАННОГО ПРОТЕИНА БАКТЕРИИ *BRUCELLA ABORTUS* OMP 16
НА ОСНОВЕ *NICOTIANA TABACUM*, КАК МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ
РАСТИТЕЛЬНОГО ОРГАНИЗМА****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.

Осуществлен процесс транзientной экспрессии рекомбинантного, иммуногенного белка *Brucella abortus* Omp16, в цитозоле растительной клетки *Nicotiana tabacum*. В ходе исследования был сконструирован растительный экспрессионный ICON-вектор – pO166121, несущий нуклеотидную последовательность целевого иммуногенного белка Omp16, и предназначенный для агробактериальной инфильтрации клеток *Nicotiana tabacum*. Относительно высокий уровень транзientной экспрессии целевого протеина в растениях (>1% от суммарного белка) позволил нам сделать вывод об эффективности применения данной методики для дальнейшей разработки на ее основе вакцинных препаратов.

Введение

Основой профилактики инфекционных заболеваний во всем мире остается до настоящего времени вакцинация. Вакцинные препараты, выпускаемые сегодня фармацевтической промышленностью с использованием традиционных технологий, являются высокзатратными, и требуют для своего производства огромного вложения материально-технических и трудовых ресурсов, которые исчисляются по современным канонам несколькими миллионами евро за отдельную вакцинную единицу. Кроме этого, для сохранения и транспортировки готовых вакцинных препаратов, а также для их практического применения необходимы стационарные условия, сопряженные с соблюдением стерильности и особого температурного режима, не допускающего их перегрева [1]. Поиск новых альтернативных путей производства вакцин – одна из важнейших задач, стоящих сегодня перед научно-исследовательскими

институтами всего мира. Биотехнология – одна из перспективных, быстро развивающихся областей современной биологической науки, предлагает свое решение этой давно уже назревшей проблемы. Речь идет о создании «съедобных вакцин» – революционном направлении в современной вакцинологии, основанном на внедрении в геном растения (или без такового) фрагмента генома патогенного микроорганизма, обладающего антигенными свойствами и способного вызвать иммунную реакцию в организме животного или человека после его перорального применения [2]. Создание молекулярно-генетических конструкций по высокоэффективному переносу и экспрессии антигенных детерминант патогенных микроорганизмов в клетках растений, а также разработка методик по их применению – есть основная задача данного научно-исследовательского направления.

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. [3].

Целью нашего исследования являлось получение иммуногенного мембранного белка *Brucella abortus* Omp 16 в растительных клетках. Поэтому в качестве объекта нашего исследования было выбрано растение *Nicotiana tabacum*, которое является на сегодняшний день модельным растительным организмом, хорошо изученным с молекулярно-генетической точки зрения. Это условие является необходимым для получения возможности успешного проведения с ним всего комплекса генно-инженерных манипуляций.

Другой объект нашего исследования – грамотрицательная бактерия *Brucella abortus*, возбудитель бруцеллеза людей и животных – был выбран нами по нескольким причинам, главная из которых та, что до сих пор не найдено штамма, который бы полностью предохранял от заболевания привитых им людей и животных. В силу сложности антигенной структуры возбудителя, разнообразия и изменчивости его антигенных свойств и высокой вирулентности, вакцины, приготовленные из него по традиционной технологии, не безопасны для человека и при вакцинации могут провоцировать развитие инфекционного процесса. Практическое использование таких вакцин приводило в большинстве случаев к развитию вялотекущей бруцеллезной инфекции с разнообразными осложнениями аллергического характера. В связи с этим, задача нахождения альтернативных вариантов эффективной и безопасной вакцины против бруцеллеза, способной решить проблему защиты человека и животных от инфекции, остается актуальной [4].

В данной работе описано проведенное нами исследование, на базе лаборатории «Молекулярной биологии и биотехнологии растений» Дармштадского технологического университета (Германия), по получению транзientной (временной) экспрессии иммуногенного белка Omp16, выделенного

из наружной мембраны *Brucella abortus*. Данная методика разработана для переноса вектора экспрессии целевого иммуногенного белка Omp16 в цитозоль *Nicotiana tabacum*, с целью производства и накопления этого протеина в цитоплазме растительной клетки. Данный метод отличается высокой скоростью мультипликации вирусной РНК, что ведет к достижению высокой копийности транскриптов целевых генов в цитоплазме зараженных клеток, и позволяет повысить суммарный выход иммуногенного протеина до 2-3% (а, возможно, и выше) от количества всего производимого белка в клетке [5]. Метод основан на природной способности растительных вирусов проникать в клетки растений и колонизировать растительные ткани. Благодаря этому возникает реальная возможность модификации вирусного генома и адаптации его не только в качестве вектора для широкого распространения в растении соответствующих генетических конструкций, но и в качестве матриц для транзientной экспрессии генов, кодирующих синтез белков, представляющих коммерческий интерес. Для заражения растительных тканей используются рекомбинантные генетические носители, в составе которых заключены фрагменты генома вируса табачной мозаики, со встроенным в них транскриптом чужеродного гена. Скорость мультипликации вирусной РНК в растениях чрезвычайно высока, за счёт чего достигается высокая копийность транскриптов чужеродных генов в цитоплазме заражённых клеток. Поэтому продуктивность вирусной системы экспрессии в среднем на 2 порядка выше по сравнению со стабильной трансформацией растений [6]. С другой стороны, преимуществом вирусного пути накопления белков в растениях является короткий период размножения вирусных частиц, простота инфицирования растений, а также широкий диапазон различных видов растений, которые могли бы быть использованы для этих целей. Но здесь могут возникнуть и следующие трудности.

Очень часто экспрессионные системы, идеальные для экспрессии одного гена, ока-



зываются совершенно непригодными для экспрессии другого. Кроме того, гиперэкспрессия некоторых генов может приводить к гибели растения, так как синтезируемый белок в большом количестве может оказаться токсичным [6]. Поэтому в ходе предстоящего исследования планировалось также проверить саму возможность получения Omp16 в растении.

Таким образом, целью нашего исследования являлась апробация молекулярного модульного комплекса, сконструированного на основе РНК вируса табачной мозаики (ВТМ) и предназначенного для осуществления процесса временной экспрессии целевого белка в цитозоли растительных клеток.

Материалы и методы

В работе были использованы бактериальные штаммы *Escherichia coli* TOP10 и *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, а также растения табака *Nicotiana tabacum*. Все растения табака, используемые в опыте, были высажены в виде семян непосредственно в тепличный грунт, где их выращивали в течение 6 недель при дневной (ночной) температуре +22°C (+16°C), а также 16-часовом освещении мощностью 6000 люкс.

В качестве полноценной жидкой и твердой (1,5% агар) среды для культивирования клеток бактерий использовали LB-среду, в которую добавляли, согласно инструкции [7], следующие антибиотики: карбеницилин (Carb) - 100 мг/л, канамицин (Kan) - 100 мг/л, рифампицин (Rif) - 100 мг/л, гентамицин (Gent) - 100 мг/л.

Используемая в работе нуклеотидная последовательность мембранного иммуногенного протеина *Brucella abortus* Omp16 была предоставлена нам в виде вектора pO16 1421 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 после-

довательностей, кодирующих аминокислоту гистидин (His-tag). Количество аминокислот в белке - 152, вес - 21 килодальтон (кДа), длина - около 500 пар нуклеотидов (пн). Иммуногенные свойства белка, кодируемого этой последовательностью, были протестированы на мышах в вышеупомянутой лаборатории, в результате чего была подтверждена иммуногенность рекомбинантного протеина Omp16.

Для осуществления процесса транзientной экспрессии в цитозоли клеток листовой пластинки *Nicotiana tabacum* нами были использованы три молекулярных ДНК-модуля (рис. 1):

3'-Modul (вектор pICH10990), содержащий сайт узнавания рекомбиназы AttB фага *Streptomyces* C31, а также сайт MCS с мультипле для встраивания целевого гена [8]. Альтернативный вариант вектора pICH10990 - вектор ICH7410 - несущий в своем составе ген флуоресцентного белка GFP, предназначенный для проведения контрольных исследований.

5'-Modul (вектор pICH15879), содержащий также сайт узнавания рекомбиназы AttP фага *Streptomyces* C31, и, помимо этого, две нуклеотидные последовательности, одна из которых (RdRp) кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу, служащую в дальнейшем для репликации вирусных частиц, а другая (MP) кодирует белок, участвующий в переносе вирусных частиц как внутри растительной клетки, так и за её пределами (между соседними клетками) [8]. Оба гена находятся под контролем промотора *Arabidopsis Actin 2* (Act2).

И рекомбиназа (вектор pICH10881), кодирующая саму рекомбиназу (Integrase) и сигнальную последовательность (NLS), закрепляющую рекомбиназу в клеточном ядре. Ген интегразы также находится под контролем промотора *Arabidopsis Actin 2* (Act2). Функция рекомбиназы состоит в связывании 3'-Modul и 5'-Modul, для того чтобы стала возможной транскрипция всего рекомбинантного комплекса с образованием РНК-предшественника вирусной частицы, которая после сплайсинга приобретает



способность как к трансляции (образование целевого протеина в цитозоли), так и к своей репликации (размножение вирусных частиц, способных передаваться от клетки к клетке, вызывая в них также трансляцию целевого протеина) [8].

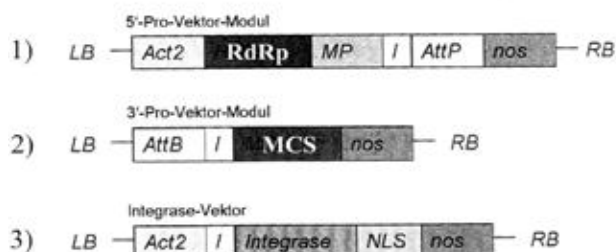


Рис. 1. Схематическое изображение ICON-векторов, предназначенных для проведения процесса транзientной экспрессии

Помимо этого, все вектора содержат терминатор Nopaline Synthase (nos), обладают маркерами к антибиотикам: Amp, Kan, Rif и Gent и содержат уникальные сайты рестрикции: BsaI, SmaI, HindIII, XbaI, KpnI.

Весь комплекс векторов для проведения процесса транзientной экспрессии был любезно предоставлен фирмой ICON Genetics, Германия.

В качестве маркера длины фрагмента ДНК при электрофоретическом разделении векторных фрагментов и продуктов ПЦР использовали ДНК фага λ , обработанного ферментом AvaII. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе «T-Gradient Thermocycler» («Biometra GmbH», Германия).

Вектора pICH10990 (рис. 2) и pO161421 подвергали ферментативному расщеплению рестриктазами XbaI и BsaI по следующей схеме [8]: 1 этап: 6 мкл - Mini-prep pICH10990 (pO161421); 2 мкл - буфер-Tango; 1 мкл - XbaI; 1 мкл - H₂O. Полученную смесь инкубировали в течение часа при температуре +37°C, затем на 20 минут в водяной бане с температурой +65°C. 2 этап: 6 мкл - H₂O; 2 мкл - буфер-Tango; 1 мкл - BsaI; 1 мкл - РНКза. Смесь инкубировали в термостате в течение часа при температуре +37°C.

Образовавшиеся «липкие концы» фрагментов ДНК-векторов были лигиро-

ваны. Реакция лигирования осуществлялась под контролем фермента T-4 лигазы и следующих продуктов: 6 мкл - Omp16 (BsaI, XbaI); 2 мкл - pICH10990 (BsaI, XbaI); 1 мкл - лигаза-буфер; 1 мкл - T-4 лигаза. Для успешного прохождения процесса «сшивки» продукты рестрикции инкубировали не менее часа при комнатной температуре [8]. В результате проведенного лигирования был получен вектор pO166121 (рис. 3), предназначенный для дальнейшего клонирования в *E. coli*.

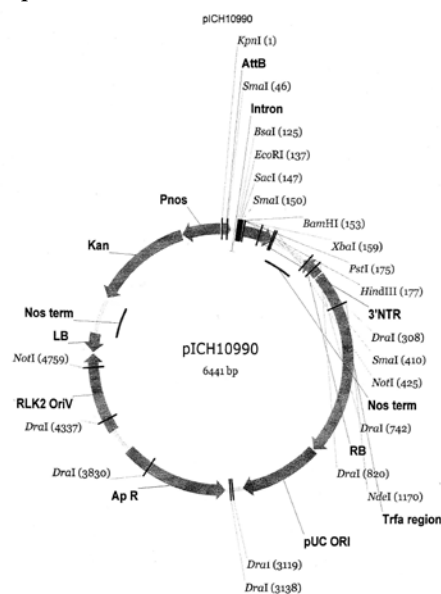


Рис. 2. Векторная карта pICH10990

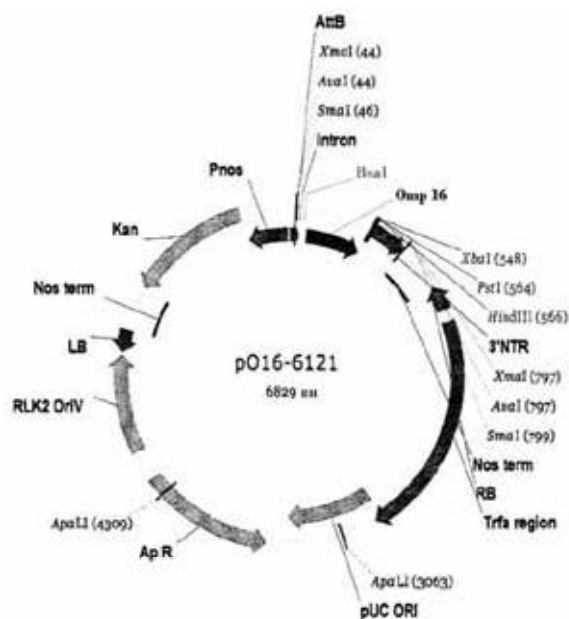


Рис. 3. Векторная карта pO16 6121

Для трансформации культуры компетентных клеток *Escherichia coli* TOP10



продуктами лигирования, на 1-1,5 мкл плазмидного материала использовали 50 мкл культуры клеток *E.coli*, хранящихся в морозильной камере при -80°C . После добавления плазмидного материала смесь погружали на 20 минут в лед, затем переносили на 1 минуту на водяную баню, нагретую до $+42^{\circ}\text{C}$ (тепловой шок). Затем к культуре клеток добавляли 500 мкл LB-среды, и инкубировали в течение 2–4 часов при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. После этого содержимое распределяли на 2 чашки Петри с агаризованной LB-средой, и с добавлением антибиотиков: рифампицин (Rif) – 100 мг/л,

гентамицин (Gent) – 100 мг/л, карбеницилин (Carb) – 100 мг/л – для модулей 3'-Modul (вектор pICH10990) и 5'-Modul (вектор pICH15879 или вектор pICH7410); и рифампицин (Rif) – 100 мг/л, гентамицин (Gent) – 100 мг/л, канамицин (Kan) – 50-100 мг/л для рекомбиназы (вектор pICH10881). После высевания культуры производили её селективное выращивание в течение суток при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в термостате. Выросшие колонии – положительные трансформанты – тестировали при помощи ПЦР с соответствующими праймерами – PO16 101; PO19 204.

Таблица 1

ДНК-праймеры для ПЦР-амплификации гена *Omp16*, встроенного в ICON-вектор

Праймер	Нуклеотидная последовательность	Фирма-изготовитель	Специализация
PO 16 101	5'ACCCATGGGCCGTATCCAGTCG3'	Metabion (Германия)	Амплификация
PO 19 204	5'TTAGGTACSTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGC3'	Oregon (Германия)	Амплификация и секвенирование N-терминального конца <i>Omp16</i>

После проведения ПЦР положительные бактериальные трансформанты переводились на инкубацию в жидкую LB-среду, содержащую соответствующие резистентности внедрённой в них плазмиды антибиотика. Процесс инкубации осуществлялся с использованием термошейкера, при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, в течение суток [7].

Процесс трансформации агробактерий осуществляли по аналогичной схеме: на 50 мкл плазмидного материала брали 100 мкл компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, хранящихся в морозильной камере при -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 $+42^{\circ}\text{C}$. Затем к культуре клеток добавляли 500 мкл LB-среды без растворенных в ней антибиотиков и оставляли на 2–4 часа в термошейкере при температуре $+28^{\circ}\text{C}$. После этого инкубируемую смесь высевали на агаризованную LB-среду, содержащую

антибиотики: рифампицин (Rif) – 150 мг/л, гентамицин (Gent) – 12,5 мг/л, карбеницилин (Carb) – 50-100 мг/л – для модулей 3'-Modul (вектор pICH10990) и 5'-Modul (вектор pICH15879 или вектор pICH7410); и рифампицин (Rif) – 150 мг/л, гентамицин (Gent) – 12,5 мг/л, канамицин (Kan) – 50-100 мг/л для рекомбиназы (вектор pICH10881). После высевания клеточной культуры производили её селективный отбор в течение 2–3 дней при температуре $+28^{\circ}\text{C}$. Выросшие колонии *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 – положительные трансформанты – предварительно тестировали при помощи ПЦР на наличие корректных нуклеотидных последовательностей, принадлежащих используемым нами модулям, и после нахождения таковых агробактериальные трансформанты инкубировали в жидкой питательной LB-среде, содержащей соответствующие антибиотики. Данный процесс осуществляли с использованием термошейкера, при температуре $+28^{\circ}\text{C}$, в течение 2-3 суток [7]. На третьи сутки все три культуры (по 100 мкл)



по отдельности центрифугировали в течение 10 минут при скорости 6 000 оборот/мин. Выпавший клеточный осадок разводили в 100 мл ICON-буфера, содержащем 10 мМ MES (pH 5,5) и 10 мМ $MgCl_2$, и затем все три раствора, содержащие каждый соответствующий агробактериальный трансформант, в соотношении 1:1:1 смешивали в общем сосуде и общий объем полученного раствора доводили добавлением ICON-буфер до 2 литров. Перед смешиванием клеточные суспензии агробактерий выравнивали по оптической плотности [8].

Для проведения агробактериальной инъекции в листья *Nicotiana tabacum* отбирали 10-15 6-недельных растений, у которых предварительно удаляли все пазушные и верхушечные почки, а также мелкие и дефектные листочки. При помощи шприца в нижнюю поверхность листовой пластинки впрыскивали приготовленный раствор, содержащий все три рекомбинантных вектора. Затем инфицированные растения переносили в тепличные условия, и оставляли в течение 10 дней при дневной (ночной) температуре +22°C (+16°C), и 16-часовом освещении мощностью 6000 люкс [8]. Через 4 дня инфицированные растения тестировали на наличие экспрессии целевого продукта, при помощи Western Blot, а также при помощи флуоресцентного белка GFP, благодаря которому можно визуально проследить скорость накопления в растении целевого белкового материала.

К моменту окончания эксперимента (спустя 10 дней с момента инфильтрации) срывали листовые пластинки всех растений, листовую ткань растений (около 250 мг) растирали в жидком азоте и экстрагировали белки в 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0 (w:v=1:1) в течение 30 минут на льду. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000 g в течение 20 минут.

Из полученного суммарного белкового экстракта при помощи Protino Protein Systems MN, фармацевтической компании Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Germany, выделяли целевой белок, который в дальнейшем подвергали процедуре очистки при

помощи специального фильтра – Amicon Ultra 15 Filter System, корпорации Billerica MA 01821 (США).

Количество белка Omp16 в очищенном экстракте определяли при помощи BSA Protein Assay Kit (BCA), используя установку TECAN infinite M200 (Германия), для определения адсорбции при длине волны 595 нм, а также программы Excel (Microsoft), обрабатывающей полученные измерения для построения калибровочной кривой.

Результаты и их обсуждение

Как упоминалось ранее, в качестве исходных векторов для создания вектора pO16 6121, предназначенного для инфильтрации растительных клеток, были использованы: ICON-вектор pICH10990, и вектор pO16 1421, несущий нуклеотидную последовательность целевого иммуногенного белка Omp16.

После проведения рестрикции обоих векторов ферментами *BsaI* и *XbaI* (рис. 4), и извлечения необходимых нам фрагментов рестрикции из геля, при помощи Nucleo Spin Extract II Kit, было произведено их лигирование с последующей трансформацией компетентных клеток *E.coli*.

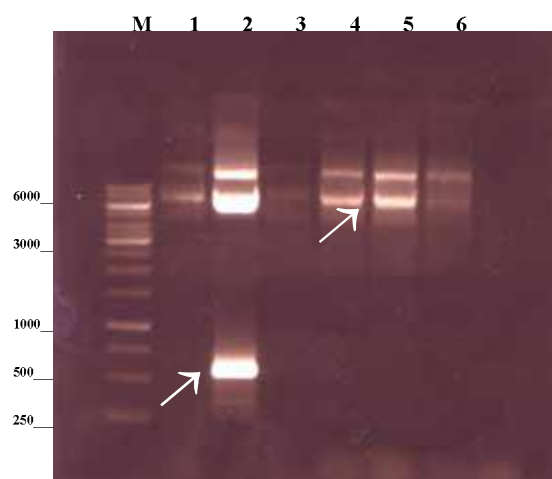


Рис. 4. Продукты рестрикции векторов pICH10990(6441пн) и pO16 1421(6011пн) по сайтам рестрикции *BsaI* и *XbaI*

M – маркерные ДНК-фрагменты, размеры которых указаны слева в нуклеотидах. 1, 2, 3 – продукты рестрикции вектора pO16 1421. Дорожка на 500 нуклеотидов соответствует массе целевой нуклеотидной последовательности Omp16; 4, 5, 6 – продукты рестрикции вектора pICH10990.



Вырезанный фрагмент равен 34 нуклеотидам, и на фотографии практически не виден. Для проведения лигирования были элюированы из геля фрагменты рестрикции, указанные стрелками.

Клеточная культура *E.coli* использовалась для клонирования созданной векторной конструкции рО16 6121. Затем очищенные по методу Birnboim & Doly [9] векторные конструкции рО16 6121 использовались непосредственно для трансформации клеток *A.tumefaciens*. Трансформация *A.tumefaciens* длилась 3 суток при температуре 28°C на твердой питательной LB-среде, содержащей антибиотики: рифампицин, гентамицин и карбеницилин. После проведения ПЦР (рис. 5) трансформированные колонии агробактерий были отобраны и инкубированы в жидкой питательной LB-среде с соответствующими антибиотиками в течение 3 суток при +28°C.

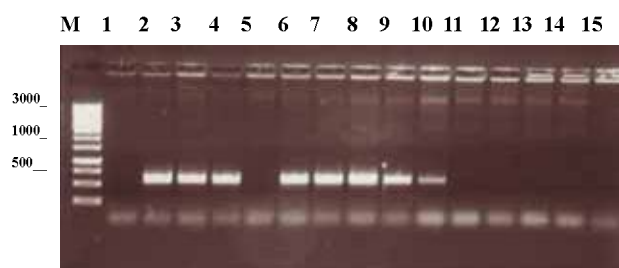


Рис. 5. Электрофорез в 1% агарозном геле продуктов ПЦР-амплификации с праймерами РО16 101 и РО19 204 трансформированных клонов *A.tumefaciens*

М – маркерные ДНК-фрагменты, размеры которых указаны слева в нуклеотидах; 1-15 – продукты ПЦР-амплификации с использованием ДНК-полимеразы Tag. Дорожки на 500 нуклеотидов соответствуют целевой нуклеотидной последовательности Omp16, встроенной в ICON-вектор рО16 6121. Для осуществления дальнейшей инфильтрации растений *Nicotiana tabacum* были отобраны колонии *A.tumefaciens* №2 и 8.

Для инфильтрации листовых пластинок *Nicotiana tabacum*, помимо приготовленных нами *A.tumefaciens*-трансформантов вектором рО16 6121, использовались также колонии *A.tumefaciens*, трансформированные векторами рICN7410, рICN15879 и рICN10881 (как было упомянуто в разделе «Материалы и методы»).



Рис. 6. Экспрессия гена GFP в *Nicotiana tabacum*

Контрольное растение *Nicotiana tabacum* в УФ-свете, спустя 4 дня после его инфильтрации векторной комбинацией рICN7410, рICN15879 и рICN10881. Светящиеся точки на листовой поверхности *Nicotiana tabacum* указывают на экспрессию флуоресцентного белка GFP.

На 4 сутки после проведения инфильтрации листовых пластинок *Nicotiana tabacum* векторными конструкциями, содержащими целевой ген Omp16, а также ген GFP (рис. 6) для осуществления контроля за ходом процесса экспрессии, растения были протестированы.

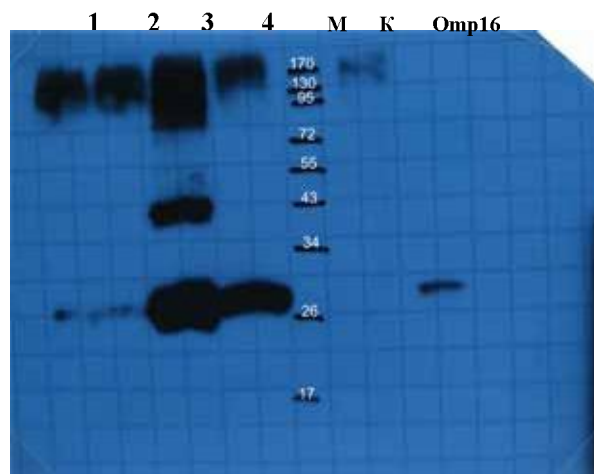


Рис. 7. Определение транзientной экспрессии Omp16 в *Nicotiana tabacum* при помощи Western Blot

Проведенные тесты показали наличие в тканях растения желаемого белка (рис. 7), что свидетельствовало об успешном прохождении процесса временной экспрессии Omp16 в цитозоли растительных клеток *Nicotiana tabacum*. Значит, транзientная



экспрессия мембранного иммуногенного белка *Brucella abortus* в растительной клетке – возможна.

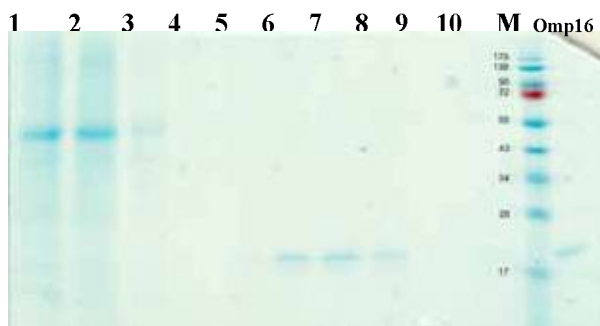
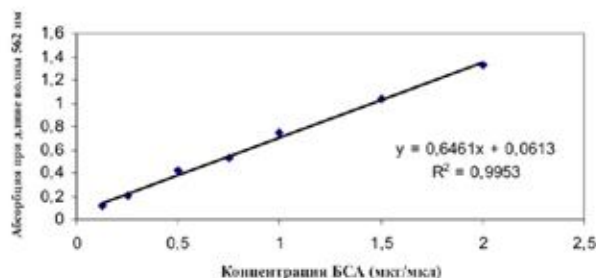


Рис. 8. Окрашенный Coomassie SDS-гель, показывающий наличие целевого иммуногенного протеина Omp16 в листовом экстракте *Nicotiana tabacum*

1 – экстракт листьев *Nicotiana tabacum*, смешанный со связывающим Omp16 матриксом; 2 – экстракт листьев *Nicotiana tabacum*, без отфильтрованного из него связывающего Omp16 матрикса; 5-10 – пробы, показывающие суммарное содержание Omp16, извлеченного из экстракта листьев *Nicotiana tabacum*; М – маркерные белки, размеры которых указаны в кДа; Omp16 – проба с очищенным белком Omp16.

Спустя 10 суток после инфильтрации растений была произведена окончательная оценка результативности транзientной экспрессии Omp16 в клетках листовых пластинок *Nicotiana tabacum*. Для этого

целевой белок вначале был извлечен из листового материала и очищен (рис. 8). Затем при помощи БСА была произведена его количественная оценка и выстроен график.



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

Приведенные данные позволяют утверждать, что рекомбинатный протеин Omp16 достаточно устойчив к действию протеаз растительной клетки, и относительно высокий уровень его экспрессии в растениях (>1% от суммарного белка) позволяет нам сделать вывод об эффективности применения данной методики для производства мембранного иммуногенного протеина *Brucella abortus* Omp16 в цитозоли растительных клеток *Nicotiana tabacum*.

Таблица 2

Определение концентрации иммуногенного протеина Omp16 в листовом экстракте *Nicotiana tabacum* при помощи БСА-проб

Абсорбция при длине волны 562нм	Концентрация БСА (мкг/мл)								Omp16 1:10
	0,0625	0,125	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	
1 измерение		0,1189	0,1644	0,4151	0,5771	0,6445	1,0782	1,3562	0,0499
2 измерение	0,0643	0,103	0,2128	0,4105	0,452	0,6301	0,9992	1,3216	0,0692
3 измерение		0,1196	0,2396	0,448	0,5543	0,6775	1,0252	1,3108	
Среднее значение	0,0643	0,1138	0,2056	0,4245	0,5278	0,6507	1,0342	1,3295	0,0692

Omp16 1:10	0,1060 мкг/мл
Omp16	1,060 мкг/мл

Заключение

Таким образом, нам удалось осуществить процесс транзientной экспрессии иммуногенного белка Omp16 в цитозоле растительной клетки *Nicotiana tabacum*. По-

лученные результаты могут представлять интерес для дальнейшей разработки и совершенствования технологии транзientной экспрессии иммуногенных протеинов в растениях, а также служить основанием для организации производства растительных вакцин, как альтернативного варианта к традиционным способам их производства.



В этом актуальном направлении современной биологии есть еще множество вопросов, ждущих своего объяснения и решения. Но все же главный, основополагающий принцип возможности создания на растительной основе вакцинных препаратов, эффективных для иммунизации животных

и человека – был доказан. Дальнейшие попытки ученых, относящиеся к усовершенствованию имеющихся технологий, приведут в ближайшем будущем к открытию механизмов производства высококачественных и дешевых растительных вакцин.

Литература

1. Walmsley A., Amtzen C. Plants for delivery of edible vaccines // *Current Opinion in Biotechnol.* - 2000. - V. 11. - P. 126-129.
2. Tacket C., Mason H. A review of oral vaccination with transgenic vegetables // *Microbes and Infection.* - 1999. - V. 1. - P. 777-783.
3. T.A. Brown. *Gentechnologie für Einsteiger* // Spektrum. Akademischer Verlag. München. - 2007. - 5. Auflage.
4. 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.
5. Ruf, S., M. Hermann, I.J. Berger, H. Carrer and R. Bock // Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // *Nat Biotechnol.* – 2001. 19(9): 870-5.
6. Marillonnet, S., C Thoeringer, R. Kandzia, V. Klimyuk and Y. Gleba // Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants // *Nature Biotechnology.* – 2005. - 23(6): 718-723.
7. 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.
8. Hellens, R.P., A.C. Allan, E.N. Friel, K. Bolitho, K. Grafton, M.D. Templeton, S. Karunairetnam, A.P. Gleave and W.A. Laing // Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants // *Plant Methods.* – 2005. - 1:13.
9. Birnboim, H.C. and J. Doly // A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1979. - 7(6): 1513-23.

Түйін

Nicotiana tabacum өсімдік торшасының цитозолінде Omp16 *Brucella abortus* ерекшеленген, имунделген белогінің транзисттік экспрессиясы жүзеге асырылды. Зерттеу нәтижесінде Omp16 біртұтас иммуногендік нуклеотидтік тізбегі бар өсімдік pO166121 ICON-векторы құрастырылды, және ол *Nicotiana tabacum* жасушаларын агробактериялық инфильтрациялауға арналған. өсімдіктердегі (>1% жиынтық белоктан) транзисттік экспрессияның мақсатты протеиннің жоғары деңгейі оның негізінде вакциналық препараттарды әрі қарай әзірлеу үшін осы тәсілді пайдалану тиімділігі туралы бізге қорытынды жасауға мүмкіндік берді.

Summary

The process of transient expression, of immunogenic recombinant protein, Omp16 allocated from *Brucella abortus*, in cytozole of vegetative cage *Nicotiana tabacum* is carried out. During the research the vegetative express ionic ICON-vector – pO166121, containing nuclear sequence of target immunogenic protein Omp16, intended for agrobacterial infiltrations of *Nicotiana tabacum* protein, has been designed. A relatively high level of transient expression of a target protein in plants (>1% from total protein,) has allowed us to draw a conclusion about efficiency of application of the given technique for further elaboration of vaccine preparations on its basis.