

# ПЛАСТИДНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАЛЛУСОВ РАСТЕНИЙ ТОМАТА БИОБАЛЛИСТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ОНКОГЕННОЙ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ

А.С. Столбиков<sup>1,2</sup>, Р.К. Салаяев<sup>1</sup>, Н.И. Рекославская<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия, [valkir5@yandex.ru](mailto:valkir5@yandex.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

**Аннотация.** Проведена пластидная трансформация каллусов растений томата генетической конструкцией, содержащей целевой ген *hrv16 L1*, кодирующий синтез основного антигенного белка папилломавируса высокоонкогенного типа HPV16 L1. Трансформация была осуществлена биобаллистическим методом. В результате удалось получить опытные растения способные синтезировать антигенный белок HPV16 L1 в количестве до 5300 нг/мг общего растворимого белка (ОРБ).

**Ключевые слова:** каллусы, биобаллистическая трансформация

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1378-1380

Использование генно-инженерных методов в создании вакцин на основе растительных экспрессионных систем является относительно новым и в то же время перспективным направлением биологии. Для получения модифицированных растений в более ранних работах нами чаще всего применялся метод трансформации *in planta* [Салаяев и др., 2010]. В итоге удалось получить генетически модифицированные растения, синтезирующие ряд целевых антигенных белков в количествах до 200 нг/мг ОРБ [Салаяев и др., 2012].

Анализ литературных данных показывает, что биобаллистическая трансформация в сочетании с использованием целевых генов с пластидной адресацией дает возможность получить растительный материал с большим содержанием целевых антигенов. Главным преимуществом данного метода является высокая эффективность встройки векторной ДНК.

Эти данные, свидетельствуют также о том, что при пластидной трансформации удаётся получать достаточно высокий уровень целевых белков [Dresen et al., 2010; Oey et al., 2009; Fernandes-San Millan et al., 2008; Lossl, Waheed, 2011; Ruhlman et al., 2010]. Особенностью пластид является то, что они передаются только по материнской линии и, следовательно, не содержатся в пыльце. Поэтому пластидная трансформация по сравнению с обычными способами генетической модификации растений считается более безопасной для окружающей среды, так как не происходит неконтролируемого распространения трансгена. Поскольку интеграция в пластиды происходит в результате гомологичной рекомбинации, отсутствует эффект случайной встройки гена, который наблюдается при ядерной трансформации растений. В пластидах практически не происходит сайленсинг трансгена, поэтому его экспрессия стабильно сохраняется в последующих поколениях [Щелкунов и др., 2011]. Однако при пластидной трансформации растений могут возникать проблемы с достаточно продолжительным периодом культивирования тканей из-за их низкого регенерационного потенциала. Низкий регенерационный потенциал связан с тем, что в работах зачастую в качестве

объекта используют фрагменты листовой пластинки растений. Поэтому для получения растений, которые продуцируют целевые белки, по нашему мнению, целесообразней использовать для биобаллистической трансформации каллусы, зародыши или меристематические зоны эксплантов.

Целью данной работы было использование биобаллистической трансформации каллусов растений томата для получения кандидатных вакцин. Для трансформации каллусов использовался ген высокоонкогенного вируса папилломы человека hrv16 L1 с пластидной адресацией, кодирующий синтез основного антигенного белка L1.

**Материалы и методы.** Каллусы для трансформации получали из зародышей семян томата (*Lycopersicon esculentum*) сорта Вентура.

Зародыши растений извлекали путём препарирования стерильным лезвием или скальпелем набухших семян томата. Культивацию зародышей осуществляли на питательной среде (MS + кинетин, индолилуксусная кислота) в течение 1–3 недель вплоть до образования каллусов. Полученные каллусы помещали на среду с повышенной осмотикой PAGAR (диск фильтровальной бумаги, покрытый слоем среды следующего состава: 1/2 MS, 0,125 М маннитола, 0,125 М сорбитола, 3% сахарозы).

Генетическую трансформацию проводили в стерильных условиях посредством использования пневматической генной пушки конструкции Саляева [Жимулёв, 2003]. В качестве «микроснарядов» использовали вольфрамовый порошок M17 (Bio-Rad) с диаметром 1,1–1,2 мкм. Ген hrv16 L1 был помещен в векторную систему pUC57, клонируемую в *E. coli*. Препаративное выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса с очисткой полиэтиленгликолем 6000. Полученную плазмидную ДНК после выделения осаждали на микрочастицы путём добавления к 25 мкл (3 мг) суспензии вольфрамовых частиц 5 мкл (5 мкг) плазмидной ДНК, 25 мкл 2,5 М стерильного CaCl<sub>2</sub> и 10 мкл 0,1 М стерильного спермидина. Суспензию объёмом 2 мкл наносили в углубление на фронтальной поверхности тефлоновых макроснарядов.

После трансформации для уменьшения повреждений, нанесённых клеткам «микроснарядами», контрольные и опытные образцы оставляли на среде PAGAR на 1–2 ч. Затем PAGAR с каллусами переносили на среду с более низкой осмотической концентрацией (без сорбитола и маннитола) и оставляли в темноте на 2–3 суток. Далее контрольные и трансформированные каллусы проращивали в герметичных сосудах на среде MS с добавлением фитогормонов и 3% сахарозы.

Эффективность трансформации геном hrv16 L1 определяли с помощью методов ИФА и ПЦР.

**Результаты.** Из каллусов, прошедших процедуру биобаллистической трансформации, были получены зрелые растения томата. ПЦР-анализ генетического материала тканей растений, подвергшихся биобаллистической трансформации, показал успешную инсерцию целевого гена hrv16 L1 в геном растений. Иммуноферментный анализ выявил присутствие в листьях и плодах опытных растений целевого белка HPV 16 L1, количество которого доходило до 5300 нг/мг общего растворимого белка (ОРБ), что было сопоставимо с показателями других работ по пластидной трансформации и приближалось к результатам, получаемым при генетической трансформации растений методом *in fruto* [Саляев и др., 2016].

**Заключение.** По результатам ПЦР и ИФА растений, прошедших биобаллистическую трансформацию геном hrv16 L1, включенным в генетическую конструкцию, имеющую пластидную адресацию, можно заключить, что биобаллистический метод, с использованием каллусов томата, позволил получить растения с увеличенным содержанием целевого антигенного белка L1.

## Литература

Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика. – Новосибирск: Сиб. ун-т., 2003. – 479 с.

Саляев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С., Третьякова А.В. Использование последовательности омега-лидера вируса табачной мозаики для трансформации плодов томата геном папилломавируса *hpv16* L1 с целью увеличения продукции антигенного белка HPV16 L1 // ДАН. – 2016. – Т. 468, № 2. – С. 225–227.

Саляев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С., Третьякова А.В. Мукозальная кандидатная вакцина против гепатита В на основе плодов томата, трансгенного по гену *preS2-S* // ДАН. – 2012. – Т. 446, № 5. – С. 583–586.

Саляев Р.К., Столбиков А.С., Рекославская Н.И., Щелкунов С.Н., Поздняков С.Г., Чепинога А.В., Хэммонд Р.В. Получение растений томата, трансгенных по гену *preS2-S-HDEL*, синтезирующих основной антигенный белок поверхностной оболочки вируса гепатита В // ДАН. – 2010. – Т. 433, № 3. – С. 419–422.

Щелкунов С.Н., Константинов Ю.М., Дейнеко Е.В. Транспластомные растения // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15, № 4. – С. 808–817.

Dresen I., Hamri G., Fussenegger M. Heat-stable oral-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection // J. of Biotechnology. – 2010. – V. 145, No. 3. – P. 273–280.

Fernandes-San Millan A., Ortigosa S.M, Hervás-Stubbs S., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J.M, Gaétan J., Coursaget P., Veramendi J. Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic // Plant Biotechnology J. – 2008. – V. 6, No. 5. – P. 427–441.

Lossl A., Waheed M. Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes // Plant Biotechnology J. – 2011. – V. 9, No. 5. – P. 527–539.

Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic // The Plant J. – 2009. – V. 57, No. 3. – P. 436–445.

Ruhlman T., Verma D., Samson N., Daniell N. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression // Plant Physiology. – 2010. – V. 152. – P. 2088–2104.

### **BIOLISTIC PLASTID TRANSFORMATION OF TOMATO CALLUS CELLS IN THE DEVELOPMENT OF VACCINES BASED ON THE PLANT EXPRESSION SYSTEM AGAINST THE ONCOGENE HUMAN PAPILLOMA**

A.S. Stolbikov<sup>1,2</sup>, R.K. Salyaev<sup>1</sup>, N.I. Rekoslavskaya<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia, [valkir5@yandex.ru](mailto:valkir5@yandex.ru)

<sup>2</sup>Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

<sup>3</sup>Irkutsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

**Abstract.** The plastid transformation of tomato callus cells with a genetic construct containing the target gene *hpv16* L1 coding the synthesis of the main antigenic papillomavirus protein HPV16 L1 was conducted. The transformation was carried out by the biolistic method. As a result, the transgenic plants expressing the antigenic protein HPV16 L1 in amount up to 5300 ng/mg total soluble protein (TSP) were obtained.

**Keywords:** calluses, biolistic transformation