

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИРУСНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА ПРИМЕРЕ ОМЕГА ЛИДЕРА ВТМ ПРИ ЯДЕРНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ

Н.И. Рекославская^{1,2}, Р.К. Салыев¹, А.С. Столбиков¹

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

²ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН, Иркутск

Основным и наиболее изученным генетическим регуляторным элементом вирусных РНК+ геномов являются 68 нуклеотидов в 5'НТО ВТМ, известные как последовательность омега (Ω). Омега представляет собой трансляционный энхансер, усиливающий кэп-зависимую трансляцию с кэпированных мРНК на порядок, то есть в 10 раз, в растительных или животных системах как *in vitro*, так и *in vivo*. Особенностью последовательности Ω 5'НТО является то, что они представляют собой структурную последовательность, лишенную почти полностью гуанозиновых остатков, но имеющих повторяющийся 11 раз САА мотив: 5'GUAUUUUUACAACAUAUACCAACAAC AA-CAAACAACAACAUAUACAUAUACUAUUUACAUAUACA3' (Salyaev et al., 2016).

Усиливающая трансляцию активность обусловлена отсутствием канонической спирали, при этом снижается зависимость от фактора eIF4A, являющегося геликазой, и от основных факторов АТФ-зависимого сканирования мРНК. Полагают также, что омега лидер способствует более быстрой интернализации вирусной частицы (её "раздеванием") и более эффективной доступности рибосом при взаимодействии с омега лидером ВТМ. Вследствие неподверженности нуклеотидов, входящих в состав трехцепочечной спирали, составленной на основе САА-элементов омеги, для РНКаз, повышается стабильность мРНК ВТМ и пролонгируется её использование в качестве матрицы.

Мы использовали последовательность омега лидера ВТМ для усиления экспрессии гена HPV16 L1 в растительной экспрессионной системе на основе плодов трансгенного томата. На рис.1 представлен дизайн генетической конструкции с геном HPV16 L1 размером в 2601 пн. Конструкция синтезирована в фирме Genscript (США), проверена секвенированием и помещена в вектор pBINPLUS/ARS.

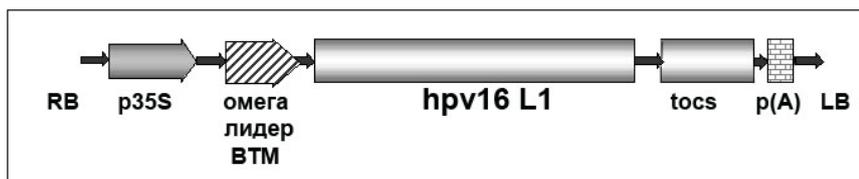
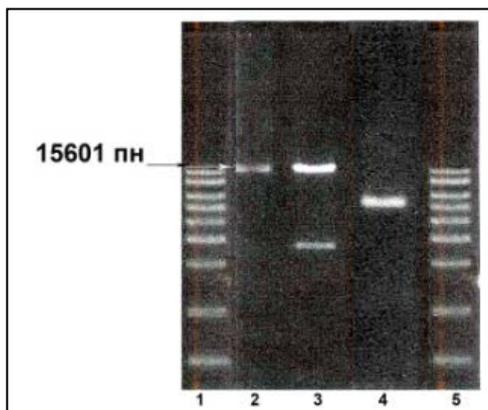


Рис. 1. Схема генетической конструкции pBINPLUS/ARSHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ размером в 2601 пн



На рис. 2, 3 и 4 приведены доказательства присутствия гена HPV16 L1 в плазмиде pBINPLUS/ARSHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ (15601 пн), вставленного по сайту HindIII.

Рис. 2. Электрофорез продуктов рестрикции pBINPLUS/ARS HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ.

1 – маркеры (ladder 10000 пн), 2 – интактная плазмида 15601 пн, 3 – рестрикт HindIII (2601 пн), 4 – рестрикт по сайту SalI, 5 – маркеры (ladder 10000 пн).

Можно видеть, что на электрофореграмме (дорожка 2) присутствует интактная плазида размером 15601 пн, которая при рестрикции рестриктазой HindIII высвобождала фрагмент в 2601 пн, соответствующий размеру синтезированной генетической конструкции (дорожка 3). Рестриктаза SalI разрешила плазмиду примерно на равные фрагменты около 5000 пн (дорожка 4).

Плазмиду pBINPLUS/ARS HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ помещали в *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 и в ней клонировали.

На рис. 3 показаны колонии pBINPLUS/ARS HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ, выросшие на среде YPD, содержащей 25 мг/л канамицина.

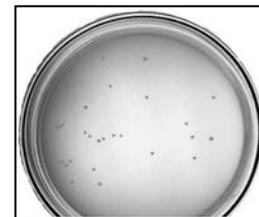


Рис. 3. Колонии *A.tumefaciens*EHA105 с плазмидой pBINPLUS/ARS HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ.

Из колоний *A.tumefaciens* с pBINPLUS/ARS HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ была выделена ДНК и препараты ДНК из этих колоний использовали для ПЦР с праймерами (Сибэнзим, Новосибирск, Россия) на фрагмент в 430 пн (с 1006 пн по 1436 пн) следующего состава: прямой праймер - 5'ССТТАТТGGTTACAACGAGCACAGGG3', обратный праймер - 5'ССТТТАААТТТАСТТСССАААААAGTG3'.

Из рис.4 можно видеть, что в ДНК отдельно взятых колоний *Agrobacterium tumefaciens* с pBINHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ присутствовал целевой ген HPV16 L1, при этом амплификаты выявили униформность.

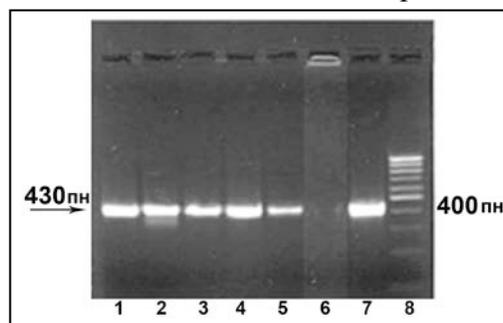


Рис. 4. Амплификаты ПЦР с ДНК колоний *A.tumefaciens* с pBINPLUS/ARS HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ.

1–5 – амплификаты с ДНК единичных колоний, 6 – ПЦР без ДНК, 7 – ПЦР по исходной плазмиде, 8 – стандарт ДНК 100 пн.

Эти колонии синтезировали белок HPV16 L1, который гибридизировался с антителами к HPV16 L1 (Santa Cruz Inc., США) (Salyaev et al., 2016). Трансформацию плодов томата проводили методом *in fructo* по разработанному нами способу (Salyaev et al., 2012).

Экспрессию целевого антигенного белка оценивали с помощью нозерн-дот-блот-гибридизации с РНК (TRI-Reagent, MRC, США) трансгенных плодов томата с применением зонда рестрицированной SacI/KpnI плазмиды с меткой DIG-11-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Германия) (рис. 5, А) и вестерн-дот-блот-гибридизации методом ECL (Amersham, Англия) экстрактов этих плодов с антителами к HPV16 L1 (рис. 5, Б). В РНК поколения T₁ также определяли экспрессию HPV16 L1 (рис. 5, В).

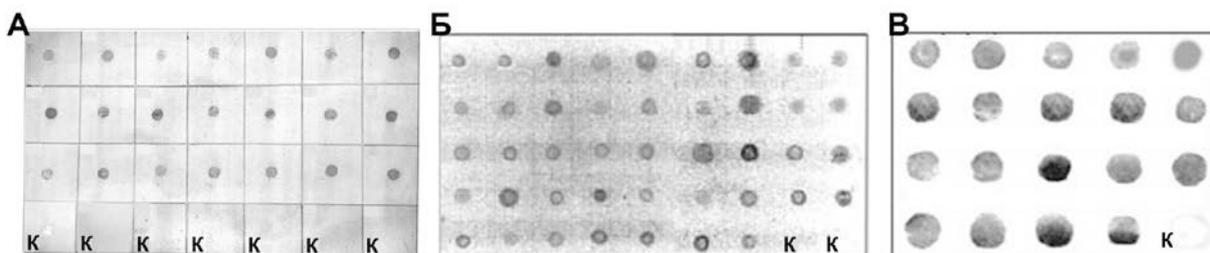


Рис. 5. Изучение экспрессии целевого белка HPV16 L1 в плодах трансгенного томата.

А – нозерн-дот-блот-гибридизация с РНК из плодов поколения T₀, Б – вестерн-дот-блот-гибридизация экстрактов из плодов томата, В – нозерн-дот-блот-гибридизация с РНК поколения T₁, К – контрольные образцы.

Из рис. 5 следует, что практически все трансформированные плоды томата экспрессировали целевой белок HPV16 L1, причем в достаточно большом количестве.

По данным денатурирующего и нативного электрофорезов (рис. 6, А и Б) можно видеть, что количество синтезированного антигенного белка HPV16 L1 достаточно велико, так как во много раз превышает стандарт 2,5 мкг HPV16 L1 (Gen Way Biotech., США).



Рис. 6. А – ДСН электрофорез экстрактов плодов томата, Б – нативный электрофорез экстрактов плодов томата.

1, 2, 3, 4, 5 и 6 – образцы экстрактов плодов, К – контроль, М – маркер 55 кДа, Нанесен стандартный раствор 2,5 мкг HPV16 L1 в пятно.

Количественный анализ проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) (рис. 7). Содержание общего растворимого белка (ОРБ) определяли по Брэдфорд. По данным ИФА количество антигенного белка HPV16 L1 (см. рис. 7) составляло до 2330 нг/мг ОРБ.

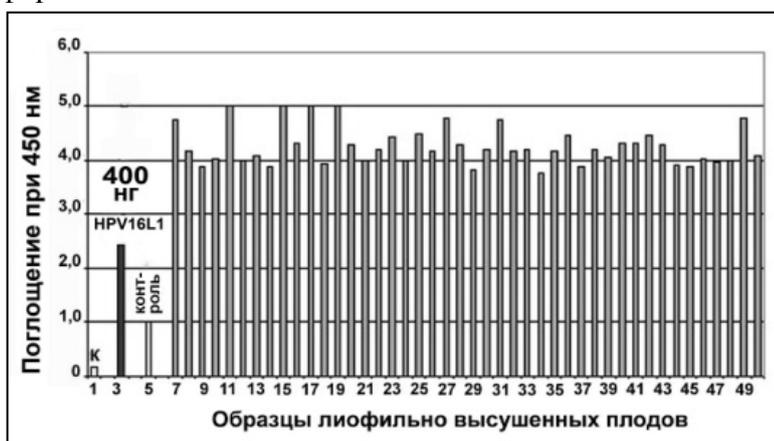


Рис. 7. ИФА HPV16 L1.

1 – К – отрицательный контроль, 3 – 400 нг стандарта HPV16 L1, 5 – контроль, контрольный плод, 7–50 – экстракты индивидуальных плодов томата, трансгенного по гену HPV16 L1.

Таким образом, в нашей работе была создана эффективная инновационная растительная экспрессионная система для синтеза антигенного белка HPV16 L1 путем ядерной трансформации плодов томата генетической конструкцией, содержащей антигенный белок HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ. Количество продуцируемого антигенного белка достигало 2330 нг/мг ОРБ. В наших предыдущих работах без использования омега лидера ВТМ уровень антигенного белка TBI-HBS составлял 20–25 нг/мг ОРБ (Salyaev et al., 2009), а содержание антигенного белка PreS2-S (Salyaev et al., 2012) было в пределах 130–211 нг/мг ОРБ, что в 100 и 10 раз меньше, соответственно, чем при использовании омега лидера. Поэтому введение вирусных регуляторных генетических элементов представляется весьма перспективным для увеличения продукции гетерологичных белков в растительных экспрессионных системах.

Литература

Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Hammond R.W., Shchelkunov S.N. Retention of the ability to synthesize HIV-1 and HBV antigens in generations of tomato plants transgenic for the TBI-HBS gene // Doklady Biochemistry Biophysics. – 2009. – V. 425. – P. 120–123.

Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Tretyakova A.V. Candidate mucosal vaccine against hepatitis B based on tomatoes transgenic for the preS2-S gene // Doklady Biochemistry Biophysics. – 2012. – V. 446. – P. 237–239.

Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Tretyakova A.V. Using the omega leader sequence of tobacco mosaic virus to transform tomato fruits with papillomavirus hpv16 L1 gene to enhance production of the antigenic protein HPV16 L1 // Doklady Biochemistry Biophysics. – 2016. – V. 468. – P. 187–189.