

УДК 577.222.7:581.1

А.В. Кузьменко, Л.В. Маринченко, Н.Л. Щербак, М.Ю. Василенко, М.В. Кучук

СТВОРЕННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН САЛАТУ, ЩО МІСТЯТЬ ГЕН ЗШИТОГО БІЛКА АНТИГЕНІВ ESAT6:Ag85B З *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Transgenic plants are promising and potentially safe tools to produce edible vaccines. Passive immunization by oral delivery of *Mycobacterium tuberculosis* antigens expressed in transgenic plants seems to be the perspective strategy to combat tuberculosis. In this paper, we discuss the generation of lettuce (*Lactuca sativa*) transgenic plants carrying the fused gene of *Mycobacterium tuberculosis* antigens ESAT6:Ag85B. By employing *Agrobacterium* mediated transformation method, transgenic plants are obtained. Vectors containing gene *esxA* fused with *fbpB* gene are used. Plasmid vectors also contain selective genes of neomycin phosphotransferase II (*nptII*) or phosphinothricin acetyl transferase (*bar*). Stable transgenic plants are selected. By using PCR analysis, we confirm the presence of target and selective genes in plants genome. Rooted plants are transferred to soil in the greenhouse for further experiments.

Вступ

Туберкульоз людини, збудником якого є *Mycobacterium tuberculosis*, — дуже розповсюджене інфекційне захворювання. Незважаючи на постійне вдосконалення методик лікування та профілактики туберкульозу, захворюваність і смертність від цієї хвороби в Україні залишаються на епідемічному рівні. Для попередження туберкульозу широко застосовується вакцинація новонароджених дітей вакциною БЦЖ, що містить ослаблені бактерії бичачого туберкульозу *Mycobacterium bovis*, якій у ряді випадків притаманні негативні побічні наслідки, а також слабка або навіть повна відсутність захисної дії в дорослому віці. Саме тому було розпочато пошук шляхів удосконалення цієї вакцини, а також пошук імуногенів для створення рекомбінантної білкової вакцини, яка б змогла замінити існуючу вакцину БЦЖ [1–4]. У різних лабораторіях світу вивчається широкий набір антигенів, які виступають мішенями імунної відповіді на *M. tuberculosis*. Найбільш перспективним є використання гібридних білків, у складі яких об'єднуються кілька антигенів або кілька епітопів із різних антигенів [5–8]. Дуже ефективним для індукції протективного імунітету на моделі туберкульозу в морських свинок виявився білок, отриманий внаслідок злиття епітопів антигенів Ag85B і ESAT6 [9]. Зшитий білок ESAT6:Ag85B проявив істотно більший імуногенний ефект, ніж окремі білки, що входять до його складу. Після введення препарату морським свинкам захисна дія від інфікування *M. tuberculosis* проявлялась на тому самому рівні, що й у БЦЖ. У результаті імунізації тварин розвиток захворювання після інфікування *M. tu-*

berculosis істотно гальмувався та збільшувалась тривалість їх життя.

У сучасній біотехнології перспективним напрямом вважається створення вакцин на основі трансгенних рослин. Рослини, в яких накопичення відповідного білка відбувається внаслідок експресії перенесених генів, можуть служити більш дешевим і безпечним джерелом рекомбінантних білків порівняно з традиційними системами експресії на основі бактерій, дріжджів, культур клітин комах і ссавців [10, 11]. Привабливість рослин як систем експресії для накопичення рекомбінантних білків зумовлена рядом обставин: рослинні тканини не мають ризику забруднення агентами, патогенними для ссавців (вірусами та пріонами); рослинні клітини забезпечують посттрансляційну модифікацію білка, характерну для еукаріотичних клітин; рослини, які не проходять попередню термічну обробку, можуть використовуватися як готовий продукт для імунізації (так звані “їстівні” вакцини). У разі споживання такої рослини імунна відповідь виникатиме під час контакту синтезованого білка зі слизовими оболонками шлунково-кишкового тракту [12, 13]. Вибір салату *Lactuca sativa* для проведення трансформації був зумовлений саме тим, що це овочева культура, яку вживають в їжу без термічної обробки.

Постановка задачі

Метою роботи є оптимізація умов регенерації та агробактеріальної трансформації салату (*Lactuca sativa*) сортів Австралійський, Одеський кучерявий, Лоло росса і Гранд рапідс, а також отримання трансгенних рослин салату, що містять ген зшитого білка ESAT6:Ag85B, який

об'єднує два секреторних антигени *Mycobacterium tuberculosis*.

Матеріали і методи дослідження

Поверхнева стерилізація, проростання насіння й умови культивування рослин. Насіння салату поверхнево стерилізували послідовною обробкою 70 %-ним етиловим спиртом (1 хв), 40 %-ним водним розчином комерційного препарату "Domestos" протягом 15 хв. Стерилізоване насіння пророщували у чашках Петрі на агаризованому поживному середовищі MS (середовище *Murashige, Skoog*, 1962) [14] при 22 °C на розсіяному світлі.

Векторні конструкції та бактеріальні штами. Для генетичної трансформації були використані вектори pCB064, pCB067, pCB168. Вектор pCB064 містив селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) та ген, що кодує послідовність зшитого білка ESAT6:Ag85B (*fbpB*

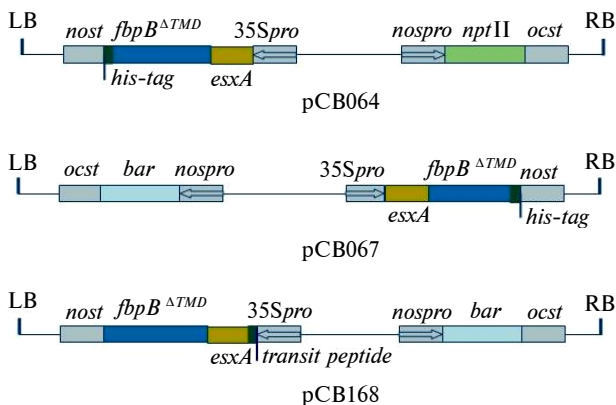


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів pCB064, pCB067 і pCB168: 35Spro – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; nospro – промотор нопалін синтази; nost – термінатор нопалін синтази; ocsf – термінатор октопін синтази; *fbpB^{ΔTMD}* – ген секреторного білка *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B; *esxA* – ген секреторного білка *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6; *bar* – ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази; *nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази II

і *esxA*), розміщений під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти. Вектор pCB067 містив такий самий цільовий ген (послідовність зшитого білка ESAT6:Ag85B), але селективний ген у цьому векторі – *bar*, що забезпечує стійкість трансгенних рослин до фосфінотрицину. У векторі pCB168 цільовий ген зшитий з послідовністю транзитного пептиду малої субодиниці РУБІСКО, яка забезпечує пластомну компартменталізацію продукту експресії (рис. 1).

Генетична трансформація рослин салату за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Для трансформації були використані сім'ядольні листки асептичних проростків салату, які культивували в розведеній 1:2 нічній культурі *A. tumefaciens* (штам GV3101), що містила відповідні генетичні конструкції. Після спільного культивування, яке тривало 15 хв, експланти інкубували на стерильному фільтрувальному папері протягом доби, після чого переносили на середовище для регенерації. Регенерацію рослин салату проводили на таких середовищах: MSR (середовище MS, доповнене 1 мг/л бензіламінопурину, 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти), B5R (середовище B5 [15], доповнене 3 мг/л кінетину, 0,4 мг/л нафтилоцтової кислоти, 400 мг/л полівінілпіралідону, 500 мг/л цефотаксиму, а також 5 мг/л фосфінотрицину або 100 мг/л канаміцину для селекції) та T-2 (середовище MS, доповнене 2 мг/л тидіазурону).

Аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для доведення наявності трансгенів у трансформованих рослинах аналізували сумарну рослинну ДНК, екстраговану ЦТАБ-методом [16]. Як позитивний контроль для реакції ампліфікації використовували плазмідну ДНК векторів, за допомогою яких проводили генетичну трансформацію рослин. Плазмідну ДНК для проведення експериментів виділяли з нічної культури *E. coli*, використовуючи лужний метод [17]. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в термоциклері Mastercyc-

Таблиця. Праймери, які були використані в роботі, для проведення ПЛР

Ген	Послідовність праймерів	Температура реасоціації, °C	Продукт ампліфікації
<i>bar</i>	5'-CCGTACCGAGCCGCAGGAAC-3' 5'-CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3'	65	463 п.н.
<i>nptII</i>	5'-CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA-3' 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCCGCTCAGAAG-3'	62	622 п.н.
<i>esxA</i>	5'-CTGACCATGGCAGAGCAGCAGTGGAAATTTTCGC-3' 5'-GAGAATTCTGCGAACATCCCAGTGCTGC-3'	65	299 п.н.

ler® personal (Eppendorf). Реакційна суміш містила 100 нг сумарної рослинної ДНК, сольовий буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 9,0, 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 0,01 % Тритон X-100), по 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, по 0,2 мкМ кожного з праймерів та 1 одиницю Taq-полімерази. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл. У таблиці подано інформацію про нуклеотидні послідовності праймерів, які використовували в роботі, та їх специфічність.

Результати і їх обговорення

Роботи зі створення трансгенних рослин салату, що містять гени антибактеріальних антигенів *Mycobacterium tuberculosis*, вже проводились раніше, і, згідно з опублікованими даними [18], такі рослини були отримані. Але наявність цільового білка в цих рослинах показана не була. Оскільки отримання трансгенних рослин, у яких проходить стабільна експресія рекомбінантного білка ESAT6:Ag85B, залишається актуальним завданням, були продовжені роботи з трансформації салату.

Була проведена агробактеріальна трансформація рослин салату (*Lactuca sativa*) сортів Австралійський, Одеський кучерявий, Лоло Росста та Гранд рапідс векторами pCB067, pCB064, pCB168, що містять ген зшитого білка ESAT6:Ag85B, який об'єднує два секреторних антигени *Mycobacterium tuberculosis* [8]. Ефективність цього зшитого білка було показано при імунізації морських свинок [9]. Векторні конструкції, що були використані в роботі, також містили ген *bar* (pCB067 і pCB168) та ген *nptII* (pCB064), що надають стійкості до селективних агентів фосфінотрицину й канаміцину відповідно.

У ході експерименту було встановлено, що для регенерації рослин салату сорту Одеський кучерявий оптимальним було середовище B5R. Ефективність регенерації рослин салату на цьому середовищі становила приблизно 95 %. Для регенерації салату сорту Гранд рапідс оптимальним було середовище MSR. На середовищі T-2 взагалі не проходила регенерація рослин салату жодного з сортів, що були використані в роботі.

Регенерація рослин після агробактеріальної трансформації (рис. 2, а) проходила на середовищі, що містило селективні агенти канаміцин у концентрації 25 мг/л або фосфінотрицин у концентрації 5 мг/л. Вкорінення рослин

також поводити на відповідному селективному середовищі (рис. 2, б, в). В експериментах на селективному середовищі вкорінювалось приблизно 80 % отриманих регенерантів.

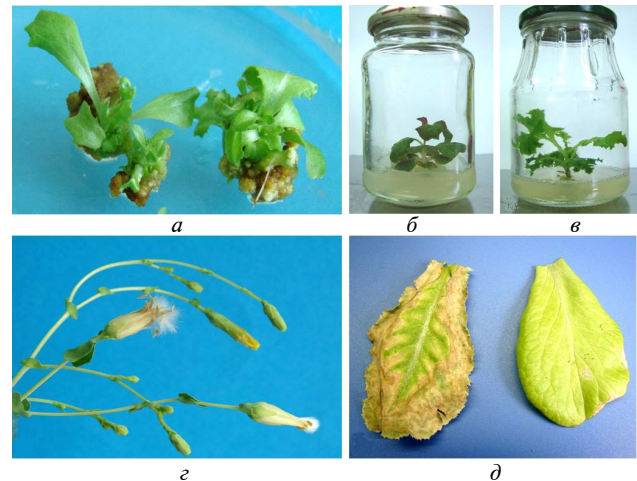


Рис. 2. Отримання трансгенних рослин салату: а – регенерація салату сорту Одеський кучерявий на селективному середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину; б, в – вкорінення на селективному середовищі, що містить 25 мг/л канаміцину і 5 мг/л фосфінотрицину відповідно; з – цвітіння трансгенних рослин салату в умовах теплиці; д – результат обробки гербіцидом “Basta” рослин салату в умовах теплиці (справа – трансгенна рослина, зліва – контроль)

У результаті експериментів з агробактеріальної трансформації плазмідами pCB067 і pCB168 було отримано рослини салату, що є стійкими до фосфінотрицину. Вкорінені на селективному середовищі рослини було висаджено в ґрунт в умовах теплиці. Рослини, що вирощувалися в умовах теплиці, були оброблені розчином гербіциду “Basta” (діюча речовина – фосфінотрицин) (рис. 2, д). Всі отримані трансгенні рослини, стійкі до фосфінотрицину в умовах *in vitro*, були стійкими до гербіциду в умовах теплиці.

Аналіз сумарної ДНК рослин, що регенерували на селективному середовищі з фосфінотрицином, проводили за допомогою ПЛР із використанням праймерів до *bar*-гена. Як видно з рис. 3, а, в усіх проаналізованих ліній рослин було доведено наявність послідовності *bar*-гена в геномі. У ліній рослин, які були відібрані на селективному середовищі з канаміцином (вектор pCB064), проводили аналіз сумарної ДНК за допомогою ПЛР з використанням праймерів до *nptII*-гена (рис. 3, б).

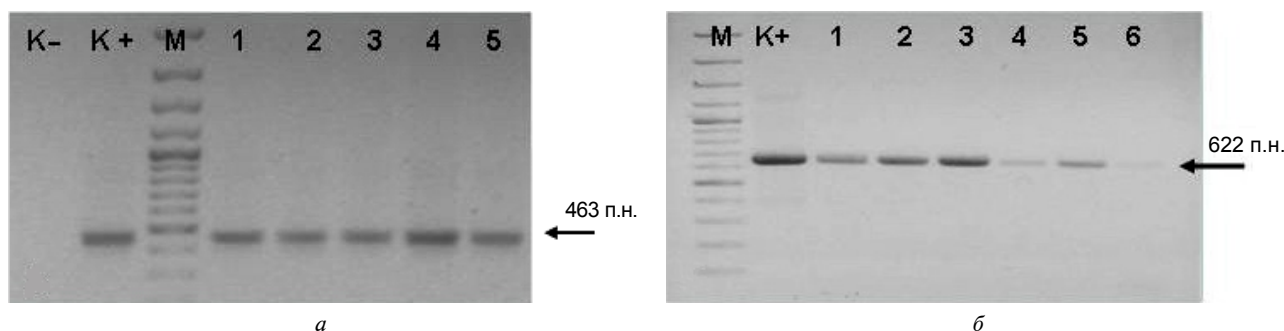


Рис. 3. Електрофореграма результатів ПЛР з використанням праймерів до генів *bar* (а) і *nptII* (б): М – ДНК-маркер; К⁻ – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини салату; К⁺ – позитивний контроль, плазмідна ДНК рСВ067 (рСВ064); 1, 2, 3 (а) – ДНК рослин салату, які регенерували на селективному середовищі після трансформації вектором рСВ067; 4, 5 (а) – ДНК рослин салату, які регенерували на селективному середовищі після трансформації вектором рСВ168; 1–6 (б) – ДНК рослин салату, які регенерували на селективному середовищі після трансформації вектором рСВ064

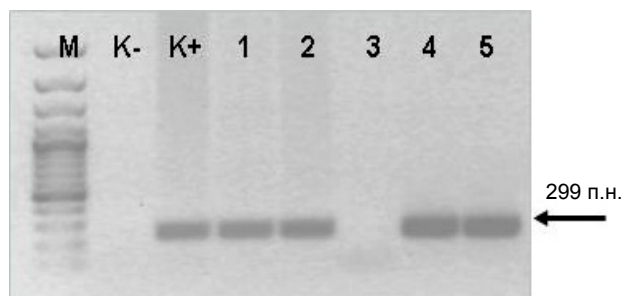


Рис. 4. Електрофореграма результатів ПЛР сумарної ДНК рослин із використанням праймерів до *esxA*-гена: М – ДНК-маркер; К⁻ – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини салату; К⁺ – позитивний контроль, плазмідна ДНК рСВ064, 1–5 – ДНК трансформованих рослин салату

Також було проведено аналіз ДНК рослин салату, відібраних на селективному середовищі, за допомогою ПЛР з використанням праймерів до *esxA*-гена, що кодує білок ESAT6. На рис. 4 подано результати ПЛР-аналізу. ДНК чотирьох проаналізованих рослин салату містила послі-

довність, що відповідає *esxA*-гену (рис. 4, треки 1, 2, 4, 5), а одна з ліній не містила цього гена (рис. 4, трек 3).

Висновки

У роботі в результаті агробактеріальної трансформації салату *Lactuca sativa* сортів Австралійський, Одеський кучерявий, Лоло росса та Гранд рапідс були отримані трансгенні рослини салату з селективним геном стійкості до фосфінотрицину та канаміцину, а також з генами секреторних антигенів ESAT6 і Ag85B, що стимулюють імунний захист від туберкульозу. Наявність цих генів у геномі рослин підтверджено аналізом за допомогою ПЛР з відповідними праймерами. Тести на стійкість до гербіциду "Basta" в умовах теплиці підтвердили експресію *bar*-гена в трансгенних рослинах.

Наступним етапом роботи планується дослідження імунної відповіді у піддослідних тварин при поїданні трансгенних рослин салату.

1. Татьков С.И., Дейнеко Е.В., Фурман Д.П. Перспективы создания противотуберкулезных вакцин нового поколения // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – 15, № 1. – С. 114–128.
2. D. Young and C. Dye, "The development and impact of tuberculosis vaccines", Cell, vol. 124, pp. 683–687, 2006.
3. I.M. Orme, "Current progress in tuberculosis vaccine development", Vaccine, vol. 23, no. 18, pp. 2105–2108, 2005.
4. P. Andersen and T.M. Doherty, "Learning from BCG: Designing a better tuberculosis vaccine", Discov. Med., vol. 5, no. 28, pp. 383–387, 2005.
5. J.A. Langermans et al., "Protection of macaques against Mycobacterium tuberculosis infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6", Vaccine, vol. 23, no. 21, pp. 2740–2750, 2005.
6. J. Davila et al., "Assessment of the genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis *esxA*, *esxH*, and *fbpB* genes among clinical isolates and its implication for the future immunization by new tuberculosis subunit vaccines Ag85B-ESAT-6 and Ag85B-TB10.4", J. Biomed. Biotechnol., 6 p., Jun. 2010.

7. C. Aagaard *et al.*, “A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure”, *Nat. Med.*, vol. 17, no. 2, pp. 189–194, 2011.
8. Y.L. Dorokhov *et al.*, “Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves”, *Tuberculosis*, vol. 87, no. 3, pp. 218–224, 2007.
9. A.W. Olsen *et al.*, “Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model”, *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 10, pp. 6148–6150, 2004.
10. S. Tiwari *et al.*, “Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens”, *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 4, pp. 449–467, 2009.
11. *Трансгенные растения для фармакологии* / Е.Б. Рукавцова, Я.И. Бурьянов, Н.Я. Шульга, В.А. Быков // *Вопр. биол., мед. и фарм. химии.* – 2006. – № 2. – С. 3–12.
12. C.O. Tacket *et al.*, “Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes”, *J. Infect. Dis.*, vol. 182, no. 1, pp. 302–305, 2000.
13. L.J. Richer *et al.*, “Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization”, *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1167–1171, 2000.
14. T. Murashige and F. Skoog, “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture”, *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473–497, 1962.
15. O. Gamborg *et al.*, “Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells”, *Exp. Cell Res.*, vol. 50, pp. 151–158, 1968.
16. J.J. Doyle and J.L. Doyle, “Isolation of plant DNA from fresh tissue”, *Focus*, vol. 12, pp. 13–15, 1990.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование* / Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 545 с.
18. *Агробактериальная трансформация салата (Lactuca sativa L.) конструкциями, несущими гены антибактериальных антигенов Mycobacterium tuberculosis* / Н.А. Матвеева, М.Ю. Василенко, А.М. Шаховский, Н.В. Кучук // *Цитология и генетика.* – 2009. – № 2. – С. 27–32.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
25 березня 2013 року