


Транспластомные растения табака, продуцирующие гидрофильный домен белка оболочки L1R вируса оспы овец

Д.К. Бейсенов , Г.Э. Станбекова, Б.К. Искаков

Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан

 e-mail: beisenov.d@gmail.com


Аннотация. Оспа овец имеет широкий географический ареал и представляет угрозу овцеводству во всем мире, так как заболевание высококонтагиозное и сопровождается большими экономическими потерями. В настоящее время для профилактики этого заболевания применяются вакцины на основе живых аттенуированных штаммов вируса. Подобные вакцины эффективны, однако потенциально опасны из-за возможной реверсии вируса к патогенному состоянию, поэтому весьма актуально создание безопасных рекомбинантных субъединичных вакцин против оспы овец. Известно, что хлоропласты растений в силу своей полиплоидности могут накапливать чужеродные белки в больших количествах. Целью данного исследования было получение транспластомных растений табака *Nicotiana tabacum*, синтезирующих один из кандидатных вакцинных белков вируса оспы овец L1R. Для проведения генетической трансформации хлоропластов создана конструкция, обеспечивающая интеграцию делеционного варианта гена *SPPV_56*, кодирующего N-концевую гидрофильную часть оболочечного белка L1R, в межгенную область *trnG/trnfM* хлоропластного генома табака путем гомологичной рекомбинации. Методом биобаллистики с помощью «генной пушки» получены линии табака, устойчивые к селективному антибиотику спектиномицину. ПЦР-анализ в присутствии ген-специфичных праймеров подтвердил интеграцию целевой вставки в растительный геном. Последующие нозерн- и вестерн-блот анализы препаратов РНК и белковых экстрактов из полученных растений показали экспрессию целевого гена на транскрипционном и трансляционном уровне. Содержание рекомбинантного белка составило ~0.9 % от общего растворимого белка. Несмотря на задержку роста и более бледную окраску листьев по сравнению с растениями дикого типа, транспластомные растения нормально развивались и завязывали семена. Оценка гомопластидности методом Саузерна выявила гетерогенность пластидных геномов полученных растений, обусловленную генетической рекомбинацией между эндогенными и привнесенными в составе конструкции хлоропластными регуляторными ДНК-последовательностями. Методом металл-аффинной хроматографии была проведена очистка рекомбинантного белка из растительной ткани. В дальнейшем планируется изучить способность продуцируемого хлоропластами белка индуцировать вируснейтрализующие антитела против штаммов вируса оспы овец. Ключевые слова: вирус оспы овец; *Sheeppox virus*; табак; *Nicotiana tabacum*; белок L1R; хлоропласты; транспластомные растения.

Для цитирования: Бейсенов Д.К., Станбекова Г.Э., Искаков Б.К. Транспластомные растения табака, продуцирующие гидрофильный домен белка оболочки L1R вируса оспы овец. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(8):905-912. DOI 10.18699/VJ20.689

Transplastomic tobacco plants producing the hydrophilic domain of the sheep pox virus coat protein L1R

D.K. Beisenov , G.E. Stanbekova, B.K. Iskakov

M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Kazakhstan

 e-mail: beisenov.d@gmail.com

Abstract. Sheep pox has a wide geographical range of distribution and poses a threat to sheep breeding worldwide, as the disease is highly contagious and is accompanied by large economic losses. Vaccines based on live attenuated virus strains are currently being used for prevention of this disease. Such vaccines are effective, but potentially dangerous because of the possible virus reversion to a pathogenic state. The development of safe recombinant subunit vaccines against sheep pox is very relevant. The high ploidy level of the plant chloroplasts makes it possible to obtain large quantities of foreign proteins. The purpose of this study was to create transplastomic *Nicotiana tabacum* plants producing one of the candidate vaccine proteins of sheep pox virus L1R. A vector containing a deletion variant of the *SPPV_56* gene, which encodes the N-terminal hydrophilic part of the viral coat protein L1R, was constructed to transform tobacco plastids. It provides integration of the transgene into the *trnG/trnfM* region of the chloroplast tobacco genome by homologous recombination. Spectinomycin-resistant tobacco lines were obtained by biolistic gun-mediated genetic transformation. PCR analysis in the presence of gene-specific primers confirmed integration of the transgene into the plant genome. Subsequent Northern and Western blot analysis showed the gene expression at the transcriptional and translational levels. The recombinant protein yields reached up to 0.9 % of total soluble protein. The transplastomic

plants displayed a growth retardation and pale green leaf color compared to the wild type, but they developed normally and produced seeds. Southern blot analysis showed heteroplasmy of the plastids in the obtained plants due to recombination events between native and introduced regulatory plastid DNA elements. The recombinant protein from plant tissue was purified using metal affinity chromatography. Future research will be focused on determining the potential of the chloroplast-produced protein to induce neutralizing antibodies against *SPPV* strains.

Key words: *Sheeppox virus*; tobacco; *Nicotiana tabacum*; L1R protein; chloroplasts; transplastomic plants.

For citation: Beisenov D.K., Stanbekova G.E., Iskakov B.K. Transplastomic tobacco plants producing the hydrophilic domain of the sheep pox virus coat protein L1R. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(8):905-912. DOI 10.18699/VJ20.689

Введение

Вирус оспы овец (ВОО, *Sheeppox virus*, *SPPV*) относится к роду *Capripoxvirus*, входящему в семейство *Poxviridae* (Tulman et al., 2002). Вызываемое им заболевание является высококонтагиозным и наносит овцеводческим хозяйствам значительный экономический ущерб, сопровождающийся сильным падежом овец, особенно среди молодняка, снижением продуктивности мяса и шерсти, повышением затрат на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий. Ареал оспы овец обширен; это эндемичное заболевание для территории Ближнего Востока, Центральной и Южной Азии, Китая, а также Центральной и Северной Африки. Вспышки оспы овец регулярно регистрируются в странах СНГ, включая Россию и Казахстан.

В России и странах СНГ для специфической профилактики оспы овец широко используются вакцины из аттенуированного вирусного штамма “НИСХИ” (Курченко и др., 1991). Вакцины, основанные на живых аттенуированных штаммах вирусов, потенциально опасны и способны рекомбинировать с образованием вирулентных штаммов. Более безопасные эффективные иммунизирующие препараты – это рекомбинантные вакцины, содержащие отдельные высокоиммуногенные поверхностные белки патогенов. Примером может служить вакцина против гепатита В, произведенная посредством встраивания поверхностного антигена вируса в геном дрожжевых клеток (McAleer et al., 1984).

Для наработки целевых рекомбинантных белков в настоящее время используют бактериальные, дрожжевые, животные, растительные и другие системы. У прокариотических систем главным недостатком является отсутствие посттрансляционных модификаций белков. Для дрожжей характерно избыточное и отличное от клеток млекопитающих гликозилирование белков. Животные системы экспрессии рекомбинантных белков чрезвычайно дорогие и позволяют получать лишь малые количества чистого продукта (Demain, Vaishnav, 2009).

Растительные системы получения рекомбинантных вакцин привлекательны в сравнении с другими системами благодаря своей низкой себестоимости и безопасности из-за отсутствия патогенов человека и животных. Трансгенные по ядру растения обычно продуцируют чужеродный белок на низком уровне (Щелкунов и др., 2011). Увеличение числа копий трансгена с целью повышения уровня экспрессии нередко приводит к его посттранскрипционному сайленсингу (Finnegan, McElroy, 1994).

Экспрессия трансгенов в пластидах имеет ряд важных преимуществ перед ядерной экспрессией. Содержание рекомбинантного белка в хлоропластах, как правило, на

несколько порядков выше по сравнению с ядерной экспрессией и может достигать >70 % от суммарного растворимого белка (Oey et al., 2009). К другим преимуществам относятся: отсутствие риска возникновения сайленсинга в отношении трансгена, защита целевых рекомбинантных белков в пластидах от клеточных протеаз, интеграция трансгена в один и тот же межгенный район пластидной ДНК, возможность одновременной экспрессии нескольких трансгенов путем объединения их в один оперон. В отличие от трансгенных по ядру растений, транспластомные растения более безопасны для агроценозов, так как хлоропласты не содержатся в пыльце и перенос трансгенов в близкородственные виды растений маловероятен (Clarke, Daniell, 2011).

Примерами успешной продукции в транспластомных растениях антигенов различных патогенов служат работы по вирусам Денге, полиомиелита, возбудителя туберкулеза, осповакцины (Rigano et al., 2009; Daniell et al., 2019; Saba et al., 2019; van Eerde et al., 2019).

В нашем исследовании в качестве трансгена был выбран один из генов ВОО – *SPPV_56*, кодирующий ортолог хорошо изученного белка L1R вируса осповакцины, применявшегося в качестве живой вакцины от натуральной оспы в XX в. Белок L1R расположен на мембране инфекционного внутриклеточного зрелого вириона (IMV) и необходим для проникновения вируса в клетку (Bisht et al., 2008). Способность L1R вызывать продукцию вируснейтрализующих антител к ВОО у лабораторных животных, иммунизированных бактериально-синтезированной укороченной формой белка (Chervyakova et al., 2016), стала основанием для того, чтобы рассматривать его в качестве кандидатной субъединичной вакцины.

Целью настоящей работы было получение транспластомных растений табака, экспрессирующих делеционный вариант гена *SPPV_56*, кодирующего экспонированный на наружной стороне мембраны вириона белковый домен, который был выбран нами в качестве кандидатной субъединичной вакцины и обозначен далее в работе как shL1RΔ.

Методы исследования

Конструирование плазмид для трансформации хлоропластов табака. Фрагмент гена *SPPV_56* (GenBank ID: NP_659632) размером 567 п. н., кодирующий N-концевую гидрофильную часть белка shL1R, ранее был клонирован нами в составе экспрессионного вектора pET19b/*SPPV_56*Δ (Бейсенов и др., 2014). Далее делеционный вариант гена ВОО последовательно переносили в плазмиды pICH11599, pHK20 и pNT4, любезно предоставлен-

ные проф. Х. Варцехой (Германия). Полученный вектор обозначили как pNT4/shL1RΔ. Все использованные в работе ферменты произведены фирмой Thermo. Целевой ген находился под транскрипционным контролем хлоропластных элементов: промотора рибосомального оперона *Prrn* и терминатора гена большой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы *TrbcL*. Вектор содержит кодирующий аминокликозид-аденилилтрансферазу маркерный ген *aadA*, придающий устойчивость к антибиотикам спектиномицину и стрептомицину и позволяющий проводить отбор трансформантов. Ген *aadA* расположен между промотором *Prrn* и терминатором пластидного гена *psbA*. Присутствующие фланкирующие последовательности обеспечивают интеграцию трансгена в межгенную область *trnG/trnM* хлоропластного генома путем гомологичной рекомбинации.

Секвенирование ДНК осуществляли с помощью коммерческого набора Big Dye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems) по методике фирмы-производителя. Считывание проводили с двух сторон с использованием ген-специфичных праймеров 56-for (5'-gcatcatatgggagcagccgtagtat) и 56-rev (5'-gcatgtcgacttatataaaaattgatataccgtatcccgca). Образцы ДНК анализировали на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

Трансформация хлоропластов. Для трансформации использовали листья растений табака *Nicotiana tabacum* (cv. Petit Havana), выращенного в асептических условиях *in vitro* на среде МС (Murashige, Skoog, 1962). Среда содержала 3 % сахарозы, 0.7 % агар. Биолистику проводили с помощью генной пушки PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad) по общепринятому протоколу (Svab et al., 1990). Для регенерации экспланты листьев помещали в чашки Петри со средой МС, содержащей 1 мкг/мл БАП (6-бензиламинопурин), 0.1 мкг/мл НУК (нафтилуксусная кислота) и 500 мкг/мл антибиотика спектиномицина (Sm). Чашки инкубировали при 23 °С, освещенности 3000 лк и световом режиме 16/8 ч (день/ночь). Каждые две недели сегменты листьев перекладывали в чашки Петри со свежей средой. Регенерировавшие в течение нескольких месяцев побеги срезали и укореняли на среде МС без гормонов с добавлением Sm.

Выделение ДНК. Препараты тотальной ДНК выделяли из 100 мг листьев табака с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) по методике производителя.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для детекции трансгена в растениях проводили в присутствии Taq ДНК-полимеразы (Thermo) и пары праймеров 56-for/56-rev. Для детекции рекомбинационного варианта использовали пару праймеров *trnH-for/aadA-rev* (5'-cacaatccactgccttgatcc; 5'-agaagaagatgccttggcctc). В качестве матрицы использовали 50 нг тотальной растительной ДНК. Температурный режим реакции: стадия 1 – 3 мин при 94 °С (1 цикл); стадия 2 – 30 с при 94 °С, 30 с при 54 °С, 1 мин при 72 °С (30 циклов); стадия 3 – 5 мин при 72 °С (1 цикл).

Вестерн-блоттинг. Препараты белков из листьев растений выделяли при помощи реагента тризол (Sigma) по рекомендации изготовителя. Концентрацию белков измеряли относительно известных концентраций бычьего сывороточного альбумина (БСА) по методу М. Брэдфорд (Bradford, 1976).

Электрофоретическое разделение растительных белков проводили в 12 % ДСН-ПАА-геле по общепринятому методу (Laemmli, 1970). Каждого образца брали по 15 мкг. После электрофореза белки переносили на PVDF мембрану (Bio-Rad) методом полусухого электроблоттинга в буфере для переноса (102 мМ глицина, 25 мМ трис-НСl, 20 % (о/о) этанола) при силе тока 0.8 мА/см² в течение 1 ч. Мембрану блокировали в 5 % обезжиренном молоке (Sigma), приготовленном в буфере ТБС (10 мМ трис-НСl, рН 7.5; 150 мМ NaCl), в течение 1 ч. Для детекции белка в качестве первичных антител использовали специфичные к белку shL1RΔ поликлональные кроличьи антитела (любезно предоставлены сотрудниками НИИ проблем биологической безопасности Республики Казахстан) или мышинные антитела к пентагистидину (5 PRIME), разведенные в блокировочном буфере в соотношении 1:4000. В качестве вторичных антител использовали антимишские или антикроличьи IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology) и разведенные в блокировочном буфере в соотношении 1:4000. Инкубацию с антителами проводили 1 ч при комнатной температуре. Отмывку от антител выполняли четырежды по 5 мин буфером TBST (TBS, содержащий 0.05 % Tween-20). В качестве субстрата использовали реагент Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3 (Sigma). Мембраны экспонировали на рентгеновской пленке (USA Scientific). Содержание белков в линиях табака определяли денситометрически с помощью программы Image J 1.42 (НИИ) относительно известных концентраций очищенного белка shL1RΔ, синтезированного в бактериях. Размер рекомбинантных белков рассчитывали в программе GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com).

Саузерн-блоттинг. Препараты тотальных ДНК, выделенных из транспластомных линий и растения дикого типа, обрабатывали рестриктазой *EcoO109I* (Thermo), подобранной в результате компьютерного анализа нуклеотидной последовательности хлоропластной ДНК табака (GenBank ID: Z00044) с помощью программы SnapGene (www.snapgene.com). После электрофореза в 0.8 % агарозном геле ДНК-фрагменты переносили на положительно заряженную нейлоновую мембрану (Macherey-Nagel). Гибридизацию проводили при 42 °С на протяжении ночи. Зонд представлял собой DIG-меченный ПЦР-продукт, полученный в ходе амплификации ДНК дикого типа с участием пары праймеров *chl-dir/chl-rev* (5'-cgacggagaggggtccacc; 5'-gaagccccttaccattctgtat). Мечение зонда и детекцию связанных фрагментов ДНК осуществляли с помощью наборов PCR-DIG Probe Synthesis Kit (Roche) и DIG Luminescent Detection Kit (Roche). Мембраны экспонировали на рентгеновской пленке (USA Scientific).

Нозерн-блоттинг. Препараты РНК выделяли с помощью реагента тризол (Sigma). Препараты РНК (5 мкг) разделяли электрофорезом в содержащем формальдегид 1.2 % агарозном геле и после переноса на нейлоновую мембрану (Macherey-Nagel) инкубировали с зондом при 50 °С в течение ночи. В качестве зонда использовали DIG-меченный ПЦР-продукт, полученный при участии плазмиды pNT4/shL1RΔ и пары праймеров 56-for/56-rev. Мечение зонда, детекцию продуктов гибридизации проводили теми же реагентами, что и в саузерн-блоттинге.

Выделение рекомбинантного белка из листьев.

1 г листьев растирали пестиком в ступке в 8 мл буфера для лизиса (50 мМ NaH₂PO₄, 0.3 М NaCl, 2 мМ имидазола, 1 % тритон X-100, 15 мМ β-меркаптоэтанол, 2 мМ PMSF, pH 8.0). Лизат центрифугировали 20 мин при 10000 g, к супернатанту добавляли 1 мл суспензии Ni-NTA агарозы (5 PRIME). Далее смесь инкубировали при покачивании в течение 1 ч на льду. После смолу промывали дважды 8 мл промывочного буфера (50 мМ NaH₂PO₄, 0.3 М NaCl, 20 мМ имидазола). Смыв белка проводили ступенчато семикратно, используя 7 мл буфера для элюции (50 мМ NaH₂PO₄, 0.3 М NaCl, 250 мМ имидазола, pH 8.0). Фракции объединяли, диализовали против калий-фосфатного буфера (pH 7.0) и концентрировали ультрафильтрацией через колонки 3.000 MWCO HY (Amicon).

Результаты

Создание генетической конструкции и трансформация хлоропластов табака

Для получения вектора, предназначенного для трансформации хлоропластов, делеционный вариант гена *SPPV_56* (включает первые 567 из 738 п. н.) клонировали в три этапа в хлоропластный вектор pNT4. На первом этапе ген *BOO* из плазмиды pET19b/SPPV_56Δ по сайтам рестрикции *NcoI/BamHI* переносили в вектор для транзientной экспрессии pICH11599, что привело к созданию плазмиды pICH11599/SPPV_56Δ. Наличие в полученной плазмиде сайта *XbaI* позволило провести последующее клонирование выщепленного рестриктазами *NcoI/XbaI* гена *BOO* в промежуточный вектор pHK20 по сайтам *NdeI/XbaI*. После обработки вставки и вектора рестриктазами *NcoI* и *NdeI* выступающие 5'-концы ДНК достраивали фрагментом Кленова в присутствии дНТФ. На третьем этапе ген *SPPV_56Δ* вместе с хлоропластным промотором *Prrn* и терминатором *TrbcL* по сайтам рестрикции *SacI/HindIII* переносили в хлоропластный вектор pNT4. Схематичное изображение созданного нами вектора pNT4/shL1RΔ, предназначенного для проведения трансформации хлоропластов, приведено на рис. 1.

Анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена *SPPV_56Δ* в составе вектора pNT4 показал, что указанная область не содержит внесенных мутаций после клонирования и полученная конструкция может быть использована в дальнейшей работе.

Процесс получения транспластомных растений методом баллистики состоял из нескольких этапов: бомбардировки целых листьев табака иммобилизованной на поверхности золотых частиц плазмидой pNT4/shL1RΔ, культивирования их на среде с гормонами и Sm, получения каллусов и отбора устойчивых к Sm регенерировавших побегов (рис. 2). В итоге были отобраны три устойчивых к Sm побега на отдельных сегментах восьми обстрелянных листьев.

Молекулярно-генетический анализ полученных растений

Далее мы провели скрининг растений на присутствие целевого гена с помощью ПЦР-метода. Из листьев тестируемых растений и растения дикого типа выделили пре-

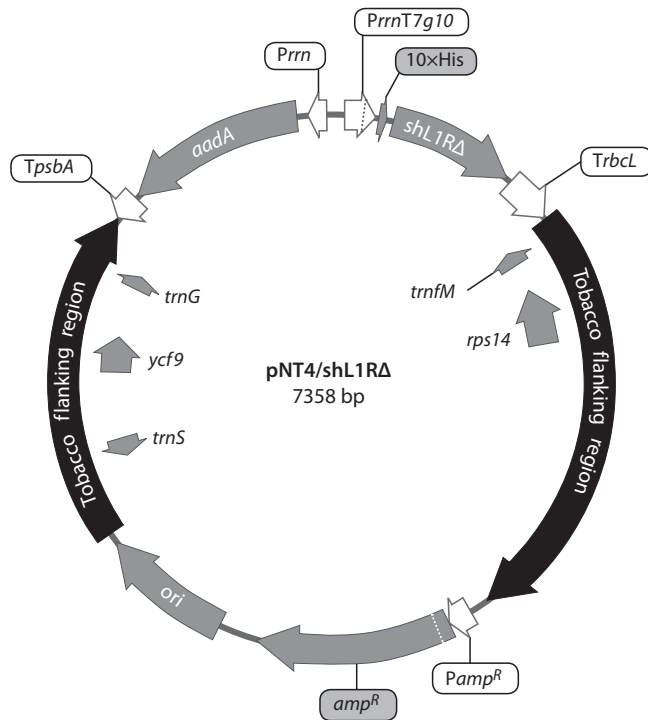


Рис. 1. Карта плазмиды pNT4/shL1RΔ.

Tobacco flanking region – фланкирующие районы хлоропластной ДНК табака; *trnG* – ген глициновой тРНК; *TpsbA* – терминатор пластидного гена *psbA*; *aadA* – ген устойчивости к спектиномицину; *Prrn* – промотор пластидного рибосомального оперона; *PrrnT7g10* – *Prrn*, слитый с 5'-не-транскрируемой последовательностью гена 10 фага T7; 10xHis – последовательность, кодирующая 10 остатков гистидина; *shL1RΔ* – делеционный вариант гена *SPPV_56*; *TrbcL* – терминатор пластидного гена *rbcl*; *trnM* – ген формил-метиониновой тРНК; *amp^R* и *Pamp^R* – ген устойчивости к ампицилину и его промотор соответственно; *ori* – участок начала репликации; *ycf9* – ген белка Z реакционного центра фотосистемы II; *trnS* – ген сериновой тРНК; *rps14* – ген рибосомального белка S14.

параты тотальных ДНК, которые анализировались с учетом пары ген-специфичных праймеров 56-for/56-rev. Как показал тест, все три отобранные линии содержали ген *SPPV_56Δ* ожидаемого размера 567 п. н. (рис. 3, а). Способность полученных линий экспрессировать целевой ген изучали на транскрипционном и трансляционном уровне. Проведенный нозерн-блоттинг препаратов тотальной клеточной РНК с применением DIG-меченного зонда к гену *SPPV_56Δ* выявил во всех полученных линиях наличие рекомбинантной мРНК двух типов (см. рис. 3, б). Наряду с моноцистронным транскриптом обнаружено присутствие более длинного продукта, по-видимому, обусловленное неэффективной терминацией транскрипции, что в целом характерно для пластид (Zhou et al., 2007; Oey et al., 2009).

Способность транспластомных линий продуцировать рекомбинантный белок shL1RΔ оценивали с помощью иммуноблоттинга с применением антител к бактериально-синтезированному shL1RΔ. Размер рекомбинантного белка в растительных экстрактах соответствовал теоретически ожидаемому 23 кДа (см. рис. 3, в). Также был выявлен белок с молекулярным весом 46 кДа, который предположительно представляет собой димерную форму shL1RΔ. Сравнительный денситометрический анализ

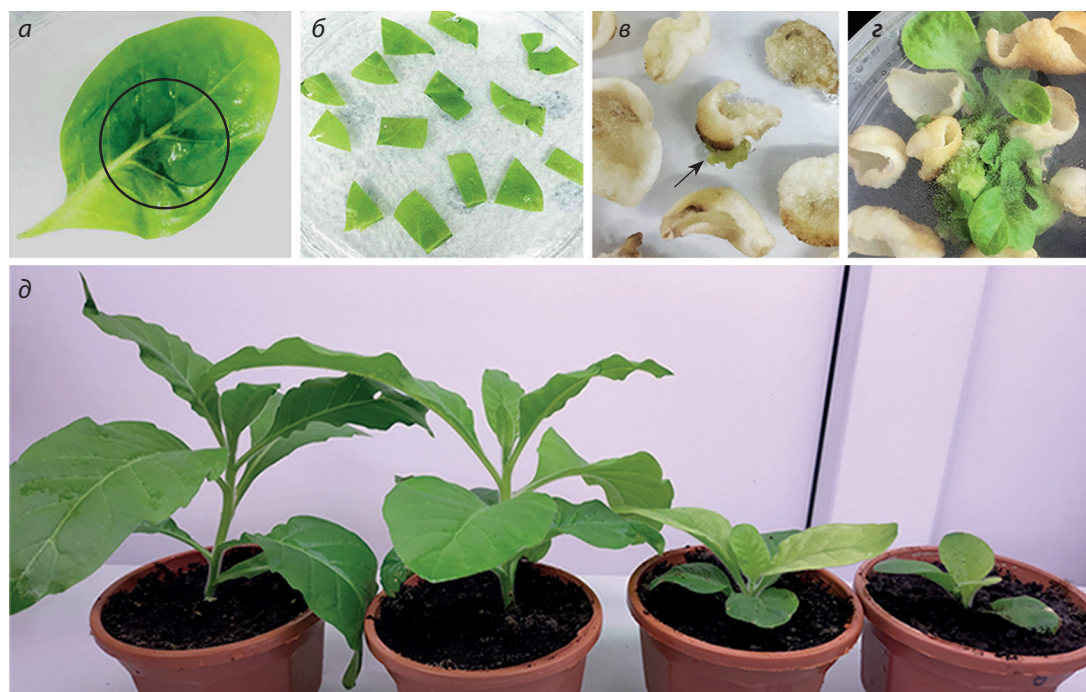


Рис. 2. Этапы получения транспластомных растений табака.

a – лист сразу после бомбардировки (отмечена область попадания микрочастиц); *б* – листовые сегменты на среде для регенерации; *в* – образование каллуса (указано стрелкой); *г* – регенерация; *д* – высаженные в грунт растения (слева – два растения дикого типа, справа – две транспластомные линии).

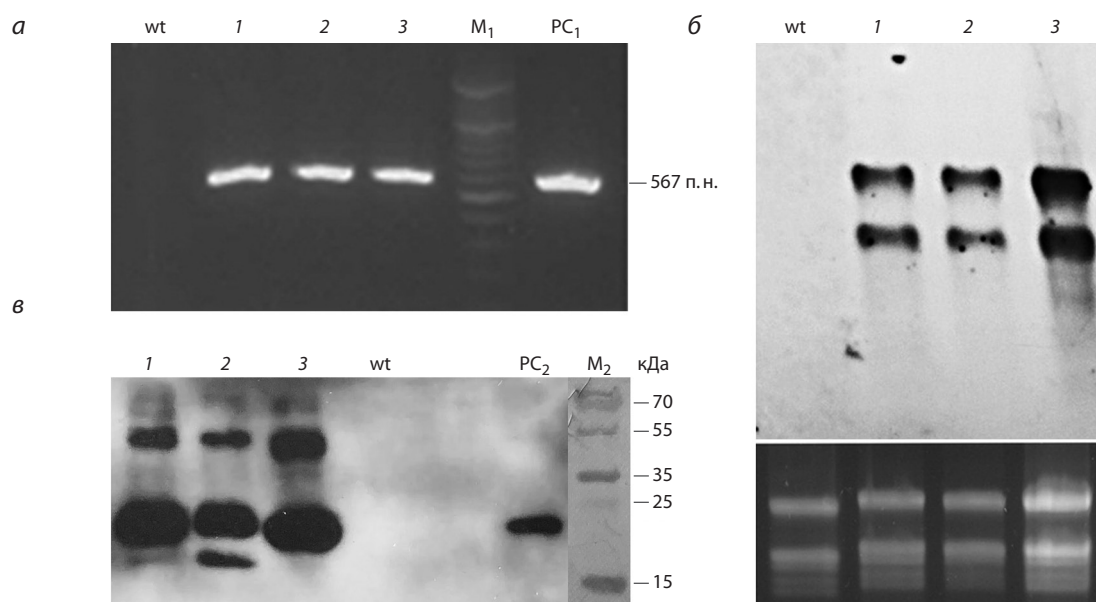


Рис. 3. Молекулярно-генетический анализ транспластомных растений.

a – ПЦР-анализ totalной ДНК из различных линий с праймерами к гену *SPPV_56Δ*; *б* – нозерн-блоттинг totalной РНК с зондом к *SPPV_56Δ* (нижний, окрашенный бромистым этидиумом гель отражает количество анализируемой РНК); *в* – вестерн-блоттинг белковых экстрактов с антителами к shL1RΔ. wt – отрицательный контроль (растение табака дикого типа); 1–3 – линии анализируемых растений; M₁ – ДНК-маркер Gene Ruler 100 bp (Thermo); PC₁ – 10 нг pNT4/shL1RΔ; M₂ – белковый маркер PageRuler Plus (Thermo); PC₂ – 20 нг бактериально-синтезированного белка shL1RΔ.

белковых полос относительно известных количеств очищенного бактериально-синтезированного shL1RΔ в трех независимых экспериментах показал, что содержание рекомбинантного белка в растениях достигает ~0.9 % от общего растворимого белка (ОРБ).

Оценка гомопластидности транспластомных растений

Для получения гомопластидных растений каждую линию подвергали дальнейшей селекции с целью элиминации пластид дикого типа и отбора трансформированных пластид. Листовые сегменты линий культивировали на среде

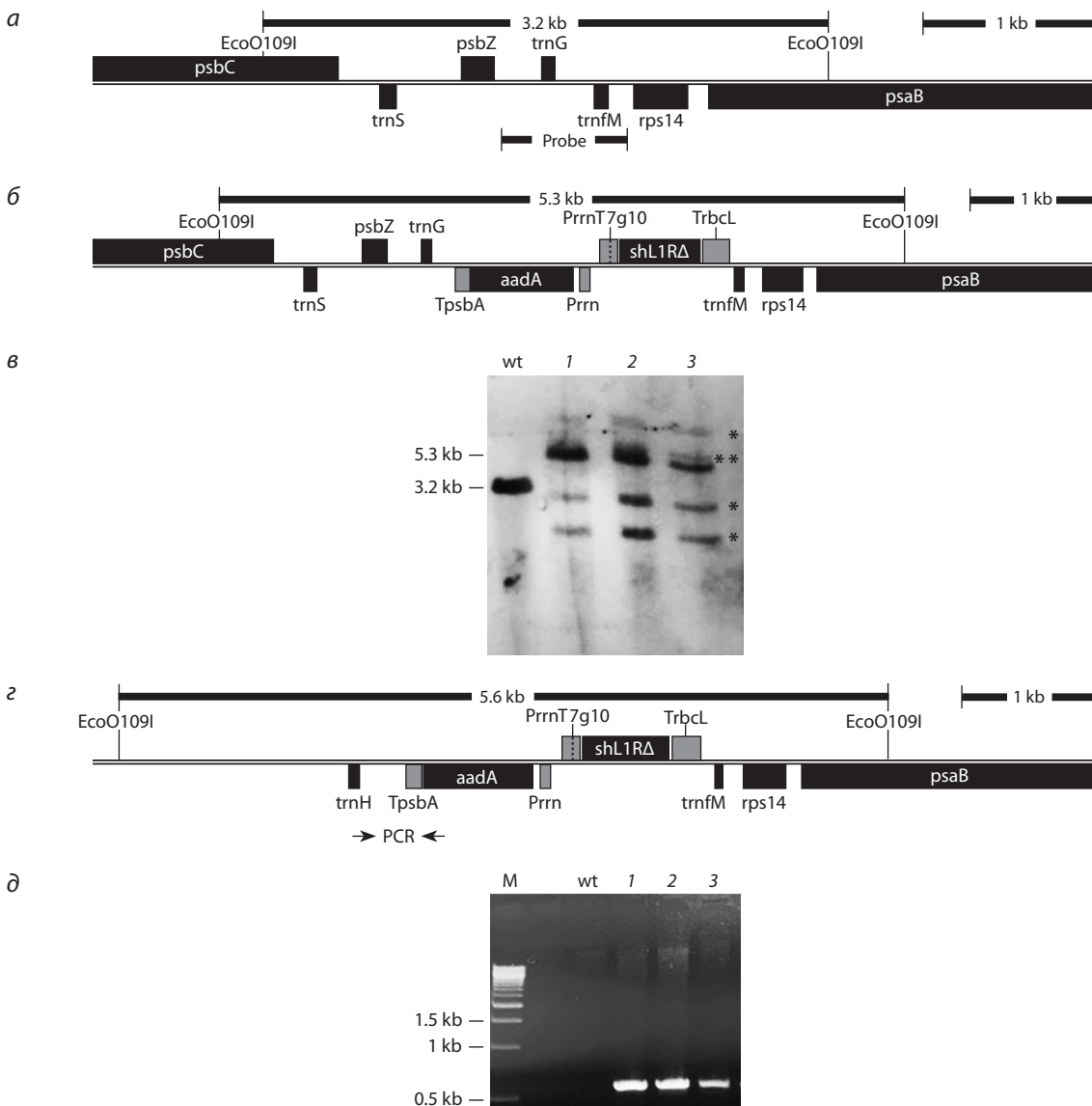


Рис. 4. Оценка гомопластидности транспластомных растений.

a – область интеграции трансгена в пластомный геном растений дикого типа; *б* – та же область в транспластомных линиях; *в* – саузерн-блот анализ с зондом к гену *SPPV_56Δ*; *г* – рекомбинационный вариант; *д* – ПЦР-анализ линий с парой праймеров *trnH*-for/*aadA*-rev. wt – растение дикого типа; M – ДНК-маркер Gene Ruler 1 kb (Thermo); 1–3 – анализируемые линии.

с гормонами и антибиотиком до появления вторичных регенерантов. Такая процедура проводилась четырежды, после чего растения поколения T_0 высадили в грунт для дальнейшего анализа. Транспластомные линии при пересадке в грунт по сравнению с диким типом показали признаки задержки роста и более бледной окраски листьев (см. рис. 2, *д*). Несмотря на это обстоятельство, все линии оказались фертильными и образовали жизнеспособные семена при самоопылении.

Гомопластидность полученных линий оценивали по полиморфизму длин рестрикционных фрагментов посредством саузерн-блоттинга с использованием меченого зонда, который охватывал сайт встраивания трансгена в пластидную ДНК между генами *trnG* и *trnfM* со смежными районами (рис. 4, *а*). Как показали результаты анализа, зонд связывался с одним ДНК-фрагментом ожидаемой длины 3.2 т. п. н. из растений дикого типа (см. рис. 4, *в*).

В транспластомных линиях помимо ожидаемого фрагмента размером 5.3 т. п. н. выявлено несколько дополнительных фрагментов (см. рис. 4, *в*, отмечены звездочками). Данный факт указывает на гетерогенность пластид у полученных нами линий, которая, возможно, вызвана межмолекулярной посттрансформационной рекомбинацией между эндогенными и привнесенными в составе конструкции пластидными регуляторными элементами: промоторами, терминаторами, 5'-нетранслируемыми последовательностями. Такие случаи описаны в ряде зарубежных работ (McCabe et al., 2008; Zhou et al., 2008; Gray et al., 2009). Свидетельством произошедших перестроек служит идентифицированный нами один из рекомбинационных вариантов (отмечен двумя звездочками на рис. 4, *в* и схематично представлен на рис. 4, *г*). Факт рекомбинации между природным и привнесенным пластидными терминаторами *TpsbA* был подтвержден ПЦР-анализом

при участии праймеров *trnH-for/aadA-rev*, в результате которого амплифицировался ДНК-фрагмент ожидаемого размера 594 п.н. (см. рис. 4, д). Остальные рекомбинационные варианты нами не изучались.

Очистка рекомбинантного белка из растительного материала

Присутствие декагистидина на N-конце рекомбинантного белка *shL1RΔ* облегчает его дальнейшую очистку методом металло-аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Предварительные эксперименты показали, что добавление в экстракционный буфер неионного детергента Тритон X-100 обеспечивало более высокий выход целевого белка по сравнению с Tween-20 и ДСН. На рис. 5 представлены результаты иммунодетекции белка *shL1RΔ* в очищенных фракциях. Белоксодержащие фракции объединили, затем диализовали против калий-фосфатного буфера и концентрировали ультрафильтрацией. Выход очищенного из листьев рекомбинантного белка составил 10.3 мкг/г сырого веса.

Обсуждение

Развитие генетической инженерии и биотехнологии за последние десятилетия открыло широкие возможности для получения вакцин нового поколения, основанных на высокоиммуногенных поверхностных антигенах патогенов человека и животных. Пластидная система наряду с транзитной растительной системой экспрессии служит дешевым источником рекомбинантных белков медицинского и ветеринарного назначения.

В настоящей работе мы описали получение транспластомных растений, продуцирующих один из кандидатных вакцинных белков, а именно укороченную форму структурного белка L1R вируса оспы овец. Ранее мы получили трансгенные растения рапса с локализацией этого же гена в ядерном геноме (Бейсенов и др., 2019). Содержание рекомбинантного вирусного белка в растениях рапса составляло около 0.1 % от ОРБ. В данном исследовании нам удалось значительно повысить экспрессию целевого гена за счет переноса его в хлоропластный геном: содержание рекомбинантного белка составило ~0.9 % от ОРБ. В дальнейшем содержание рекомбинантного белка, возможно, удастся повысить за счет встраивания искусственно синтезированного гена с кодон-оптимизированной для экспрессии в хлоропластах последовательностью, как это было продемонстрировано для антигенов вируса папилломы человека (Lenzi et al., 2008; Daniell et al., 2019).

Альтернативными подходами к увеличению содержания белка являются интеграция трансгена в область инвертированного повтора в пластидном геноме для увеличения копийности гена, добавление к белку определенных N-концевых пептидов в случае нестабильных рекомбинантных белков (Воск, 2014). Проблема гетеропластидности полученных нами растений в последующем может быть решена путем реорганизации генетической конструкции, предназначенной для трансформации. Так, в работе Ф. Чжоу с коллегами изменение ориентации целевого гена относительно гена *aadA*, приведшее к увеличению расстояния между двумя *Prrn* промоторами, позволило получить стабильные гомопластидные расте-

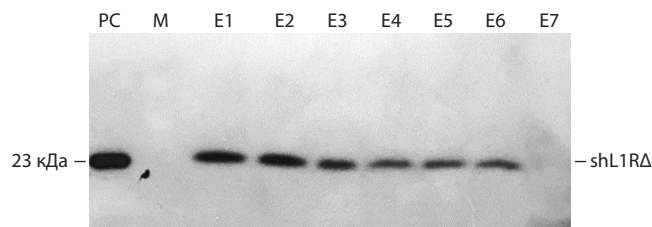


Рис. 5. Вестерн-блот анализ различных фракций, элюированных с Ni²⁺-NTA агарозы.

PC – 40 нг бактериально-синтезированного белка *shL1RΔ*; M – белковый маркер PageRuler Plus (Thermo); E1–E7 – элюированные фракции.

ния, продуцирующие антигены вируса иммунодефицита человека на уровне 40 % от ОРБ (Zhou et al., 2008). Тем не менее достигнутый уровень синтеза позволяет нам выделить достаточное количество белка, необходимого для дальнейших иммунологических исследований. В дальнейшем планируется изучить способность очищенного из растений рекомбинантного вирусного белка *shL1RΔ* вызывать выработку вируснейтрализующих антител у лабораторных животных.

Заключение

В результате проведенных исследований нами впервые показана возможность экспрессии в транспластомных растениях табака укороченной формы структурного белка *shL1R* вируса оспы овец. Синтезированный в хлоропластах рекомбинантный белок в дальнейшем может быть использован для разработки субъединичной вакцины против оспы овец.

Список литературы / References

- Бейсенов Д.К., Аргимбаева Т.У., Станбекова Г.Э., Исакаев Б.К. Синтез иммуногенного домена белка L1R вируса оспы овец в рапсе. *Ветеринария, Зоотехния и Биотехнология*. 2019;8:45-54. [Beisenov D.K., Argimbaeva T.U., Stanbekova G.E., Iskakov B.K. Synthesis of the immunogenic domain of the L1R protein of sheep pox in rapeseed. *Veterinariya, Zootekhnika i Biotekhnologiya = Veterinary, Zootechnics and Biotechnology*. 2019;8:45-54. (in Russian)]
- Бейсенов Д.К., Станбекова Г.Э., Надилова Л.Т., Исакаев Б.К. Синтез белка оболочки L1RΔ вируса оспы овец в растениях. *Вестн. КазНУ. Сер. биол.* 2014;60:187-190. [Beisenov D., Stanbekova G., Nadirova L., Iskakov B. Sheep pox viral envelope protein L1RΔ synthesis in plants. *Vestnik KazNU. Seriya Biologicheskaya = KazNU Bulletin. Biology series*. 2014;60:187-190. (in Russian)]
- Курченко Ф.П., Иванющенко В.Н., Уфимцев К.П. Эффективность сухой культуральной вирусвакцины из штамма НИСХИ против оспы овец. *Ветеринария*. 1991;10:21-24. [Kurchenko F.P., Ivanushchenkov V.N., Ufimtsev K.P. The effectiveness of dry culture vaccinia virus from the NISKHI strain against sheep pox. *Veterinariya = Veterinary Medicine*. 1991;10:21-24. (in Russian)]
- Щелкунов С.Н., Константинов Ю.М., Дейнеко Е.В. Транспластомные растения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011;15(4):808-817. [Shchelkunov S.N., Konstantinov Yu.M., Deineko E.V. Transplastome plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(4):808-817. (in Russian)]

- Bisht H., Weisberg A.S., Moss B. Vaccinia virus L1 protein is required for cell entry and membrane fusion. *J. Virol.* 2008;82:8687-8694. DOI 10.1128/JVI.00852-08.
- Bock R. Engineering chloroplasts for high-level foreign protein expression. *Methods Mol. Biol.* 2014;1132:93-106. DOI 10.1007/978-1-62703-995-6_5.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.
- Chervyakova O.V., Zaitsev V.L., Iskakov B.K., Tailakova E.T., Strochkov V.M., Sultankulova K.T., Sandybayev N.T., Stanbekova G.E., Beisenov D.K., Abduraimov Y.O., Mambetaliyev M., Sansyzybay A.R., Kovalskaya N.Y., Nemchinov L.G., Hammond R.W. Recombinant sheep pox virus proteins elicit neutralizing antibodies. *Viruses.* 2016;8:159-171. DOI 10.3390/v8060159.
- Clarke J.L., Daniell H. Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. *Plant Mol. Biol.* 2011;77:203. DOI 10.1007/s11103-011-9767-z.
- Daniell H., Rai V., Xiao Y. Cold chain and virus-free oral polio booster vaccine made in lettuce chloroplasts confers protection against all three poliovirus serotypes. *Plant Biotechnol. J.* 2019;17:1357-1368. DOI 10.1111/pbi.13060.
- Demain A.L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 2009;27:297-306. DOI 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.
- Finnegan J., McElroy D. Transgene inactivation: plants fight back! *Nat. Biotechnol.* 1994;12:883-887.
- Gray B.N., Ahner B.A., Hanson M.R. Extensive homologous recombination between introduced and native regulatory plastid DNA elements in transplastomic plants. *Transgenic Res.* 2009;18:559-572. DOI 10.1007/s11248-009-9246-3.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
- Lenzi P., Scotti N., Alagna F., Tornesello M.L., Pompa A., Vitale A., De Stradis A., Monti L., Grillo S., Buonaguro F.M., Maliga P., Cardi T. Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco. *Transgenic Res.* 2008;17:1091-1102. DOI 10.1007/s11248-008-9186-3.
- McAleer W.J., Buynak E.B., Maigetter R.Z., Wampler D.E., Miller W.J., Hilleman M.R. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature.* 1984;307:178-180. DOI 10.1038/307178a0.
- McCabe M.S., Klaas M., Gonzalez-Rabade N., Poage M., Badillo-Corona J.A., Zhou F., Karcher D., Bock R., Gray J.C., Dix P.H. Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen. *Plant Biotechnol. J.* 2008;6:914-929. DOI 10.1111/j.1467-7652.2008.00365.x.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473-497.
- Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J.* 2009;57:436-445. DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03702.x.
- Rigano M.M., Manna C., Giuliani A., Pedrazzini E., Capobianchi M., Castilletti C., Di Caro A., Ippolito G., Beggio P., De Giuli Morghe C., Monti L., Vitale A., Cardi T. Transgenic chloroplasts are efficient sites for high-yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cells. *Plant Biotechnol. J.* 2009;7:577-591. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00425.x.
- Saba K., Gottschamel J., Younus I., Syed T., Gull K., Lössl A.G., Mirza B., Waheed M.T. Chloroplast-based inducible expression of ESAT-6 antigen for development of a plant-based vaccine against tuberculosis. *J. Biotechnol.* 2019;305:1-10. DOI 10.1016/j.jbiotec.2019.08.016.
- Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990;87:8526-8530. DOI 10.1073/pnas.87.21.8526.
- Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur J.H., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J. Virol.* 2002;76:6054-6061. DOI 10.1128/JVI.76.12.6054-6061.2002.
- van Eerde A., Gottschamel J., Bock R., Hansen K.E.A., Munangandu H.M., Daniell H., Liu Clarke J. Production of tetravalent dengue virus envelope protein domain III based antigens in lettuce chloroplasts and immunologic analysis for future oral vaccine development. *Plant Biotechnol. J.* 2019;17:1408-1417. DOI 10.1111/pbi.13065.
- Zhou F., Badillo-Corona J., Karcher D., Gonzalez-Rabade N., Piepenburg K., Borchers A.M., Maloney A.P., Kavanagh T.A., Gray J.C., Bock R. High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol. J.* 2008;6:897-913. DOI 10.1111/j.1467-7652.2008.00356.x.
- Zhou F., Karcher D., Bock R. Identification of a plastid intercistronic expression element (IEE) facilitating the expression of stable translatable monocistronic mRNAs from operons. *Plant J.* 2007;52:961-972. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03261.x.

ORCID ID

D.K. Beisenov orcid.org/0000-0002-2116-7323
G.E. Stanbekova orcid.org/0000-0002-7819-6475
B.K. Iskakov orcid.org/0000-0002-5204-4377

Благодарности. Исследование выполнено в рамках научных проектов АР05132066 и АР05132532 при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Авторы выражают благодарность проф. Хериберту Варцеха (Технический университет г. Дармштадт, Германия) за передачу плазмид рICН11599, рНК20 и рNT4. Также мы благодарим сотрудников Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (Казахстан) за предоставление специфических антител к shL1RД белку.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.04.2020. После доработки 24.09.2020. Принята к публикации 26.10.2020.