

Филиал Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки
Института Биоорганической Химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук

На правах рукописи

Тарасенко Ирина Викторовна

**Разработка растительной экспрессионной платформы для получения
субстанций ветеринарного назначения на примере пептида M2e
вируса гриппа птиц H5N1.**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к. б. н. Фирсов Алексей Петрович

Пушино - 2016

1 Содержание

| | стр. |
|---|-----------|
| Список сокращений | 4 |
| Введение | 5 |
| 1 Обзор литературы | 11 |
| 1.1 Растения как платформа для биофарминга | 11 |
| 1.2 Общая характеристика <i>Lemna minor</i> L | 20 |
| 1.3 Генетическая трансформация ряски | 22 |
| 1.4 Рекомбинантные вакцины растительного происхождения | 23 |
| 1.5 Адъюванты | 33 |
| 1.6 Вирус гриппа | 37 |
| 1.7 Организация генома вирусов гриппа типа А | 40 |
| 1.8 Характеристика белка М2 | 45 |
| 1.9 Использование пептида М2е для создания универсальной противогриппозной вакцины | 49 |
| 2 Материалы и методы | 56 |
| 2.1 Используемые штаммы и плазмиды | 56 |
| 2.2 Оптимизация кодонного состава. Сборка синтетических олигонуклеотидов | 57 |
| 2.3 Молекулярное клонирование фрагментов ДНК | 59 |
| 2.4 Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля | 61 |
| 2.5 Трансформация <i>Escherichia coli</i> | 61 |
| 2.6 Перенос плазмидной ДНК в штаммы <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 62 |
| 2.7 Выделение плазмидной ДНК из клеток <i>Escherichia coli</i> | 62 |
| 2.8 Электрофоретический анализ ДНК | 62 |
| 2.9 Трансформация растений табака | 63 |
| 2.10 Трансформация растений ряски | 64 |
| 2.11 Выделение тотальной ДНК из растительных тканей | 64 |
| 2.12 ПЦР - анализ растительной ДНК | 65 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.13 | Выделение тотальной РНК из растительных тканей и ОТ-ПЦР - анализ трансгенных растений | 65 |
| 2.14 | Гистохимический анализ трансгенных растений | 66 |
| 2.15 | Выделение общего растворимого белка из растительных тканей | 66 |
| 2.16 | Определение количества белка в растительных препаратах | 66 |
| 2.17 | Вестерн-блот анализ общего растворимого белка трансгенных растений | 67 |
| 2.18 | Количественный иммуоферментный анализ слитого белка M130-β-глюкуронидаза в трансгенных растениях | 67 |
| 2.19 | Оценка содержания субъединицы Б рицина в растительных экстрактах с помощью асиалофетуина | 68 |
| 2.20 | Экспрессия субъединицы Б рицина в бактериальной системе | 70 |
| 3 | Результаты и обсуждения | 71 |
| 3.1 | Сравнительный анализ кодонного состава вируса гриппа А H5N1 и растений ряски | 71 |
| 3.2 | Оптимизация кодонного состава 5'-концевой последовательности гена M2 вируса гриппа птиц H5N1. Синтез и сборка олигонуклеотидов | 75 |
| 3.3 | Клонирование 5'-фрагмента гена M2 в векторе pUC19 и в растительном экспрессионном векторе pBI121 | 77 |
| 3.4 | Трансформация растений табака <i>Nicotiana tabacum</i> вектором pBIM2, анализ трансгенных растений | 79 |
| 3.5 | Клонирование гена M143 в трансляционном слиянии с геном β-глюкуронидазы. Анализ экспрессии слитой последовательности M143 - β-глюкуронидаза в трансгенных растения табака | 83 |
| 3.6 | Клонирование последовательностей M130 и M122 в трансляционном слиянии с геном β-глюкуронидазы. Анализ экспрессии слитых генов в трансгенных растения табака | 89 |
| 3.7 | Клонирование гена субъединицы Б рицина <i>Ricinus communis</i> в векторе pUC18. | 95 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.8 | Клонирование последовательности M130 в растительном экспрессионном векторе pBI121 в трансляционном слиянии с 5'-концом гена хитинсвязывающего домена (CBD) и 3'-концом последовательности субъединицы Б рицина | 100 |
| 3.9 | Клонирование сигнального пептида белка табака PR1a | 103 |
| 3.10 | Клонирование и экспрессия гена субъединицы Б рицина (RTB) в бактериальной системе | 108 |
| 3.11 | Получение и анализ трансгенных растений табака, содержащих последовательность слитого гена RTB-M130 | 112 |
| 3.12 | Анализ экспрессии гена пептида M2e в трансгенных растениях ряски | 120 |
| 3.12.1 | Анализ экспрессии слитого гена пептид M2e- β -глюкуронидаза | 121 |
| 3.12.2 | Анализ экспрессии последовательности пептида M2e слитой с субъединицей Б рицина | 127 |
| 4 | Заключение | 135 |
| 5 | Выводы | 137 |
| 6 | Список использованной литературы | 138 |

Список сокращений

BSA – бычий сывороточный альбумин

GUS – β -глюкуронидаза

HA (H) – гемагглютинин

NA(N) – нейраминидаза

PBS – фосфатно-солевой буфер

RTB- субъединица B рицина

SDS – додецилсульфат натрия

X-Gluc - 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-глюкуронид

а.о. – аминокислотный остаток

БАП – бензиламинопурин

ДМСО – диметилсульфоксид

ИПТГ – изопропил- β -тиогалактопиранозид

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

M2e –N-концевой фрагмент белка M2 вируса гриппа

п.о. – пара оснований

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

Актуальность темы. Одним из приоритетных направлений развития современной биотехнологии является использование растительных систем в качестве биофабрик по производству фармацевтически значимых белков. Растительные экспрессионные системы обладают значительным преимуществом перед традиционными, основанными на использовании микробных и животных клеток, так как, во-первых, производство белков в растениях не требует сложных и дорогостоящих биореакторов, что существенно снижает стоимость конечного продукта, а во-вторых, синтез рекомбинантного белка в определенных компартментах растительной клетки обеспечивает его сохранность и простоту выделения (Fischer and Emans, 2000).

Промышленное птицеводство – наиболее индустриально развитое направление сельского хозяйства, как в России, так и за рубежом. Для интенсивного ведения птицеводства всегда были актуальными проблемы связанные с инфекционными заболеваниями. Одним из таких заболеваний является грипп птиц – высоко контагиозная вирусная инфекция, которая может поражать все виды пернатых. На протяжении последних десяти лет ситуация по гриппу птиц в мире значительно осложнилась. В первую очередь это связано с появлением особо патогенных штаммов вируса H5N1 и H7N7. При неблагоприятных условиях заражение птиц этими штаммами может привести к 100% гибели поголовья. В России впервые вспышки гриппа птиц H5N1 были зарегистрированы в июле 2005 г. в Новосибирской области. По данным Россельхознадзора, с 2005 г. по 2009 гг. было зарегистрировано 179 очагов заболевания гриппом птиц H5N1 в 20 субъектах Российской Федерации, суммарные потери в птицеводстве составили более 2,8 млн. птиц. В настоящее время очаги заболевания птичьим гриппом регулярно регистрируются в Дальневосточном и Южном федеральных округах.

Вакцинация представляется наиболее эффективным средством борьбы с вирусом, но на практике возникает ряд проблем. Традиционные вакцины,

используемые в настоящее время, имеют ряд недостатков, в частности, относительно высокую стоимость производства, хранения и доставки. Хорошей альтернативой являются «съедобные» вакцины, полученные на основе различных растительных экспрессионных платформ и позволяющие существенно снизить затраты на всех этапах вакцинации, что особенно важно применительно к задачам сельскохозяйственного производства. Эффективность такого подхода была многократно подтверждена целым рядом исследований и разработок съедобных вакцин, например, против геморрагической болезни кроликов (Martin-Alonso et al., 2003), вирусной пузырчатки полости рта и конечностей домашних животных (Dus Santos et al., 2005; Huang et al., 2005), бешенства (Loza-Rubio et al., 2008), вирусного инфекционного бронхита птиц (Zhou et al., 2003,2004) и других. Основное внимание в проводимых исследованиях уделяется подбору целевых пептидов, вызывающих иммунный ответ, максимизации уровня экспрессии целевых последовательностей и анализу их стабильности в растительных тканях.

Вирус гриппа принадлежит к группе наиболее быстро мутирующих вирусов, способных избегать защитных механизмов иммунной системы хозяина. Традиционные вакцины, основанные на иммунитете против поверхностных белков вируса - гемагглютинина и нейраминидазы, быстро теряют свою актуальность и должны регулярно обновляться, поскольку эти белки в силу постоянно действующего антигенного дрейфа весьма изменчивы. Перспективным направлением в создании вакцин против вируса гриппа может стать рекомбинантная вакцина на основе высоко консервативного пептида M2e белка M2 вируса гриппа. Аминокислотная последовательность пептида M2e остается почти неизменной со времен пандемии «Испанского» гриппа 1918 г., что делает его привлекательным объектом для создания «универсальной» противогриппозной вакцины (Ma et al., 2009; Schotsaert et al., 2009). Одним из препятствий по использованию пептида M2e в создании вакцины является то, что ввиду своего малого размера (24 а.о.) пептид труднодоступен для клеток иммунной системы. Иммуногенность пептида может быть увеличена за счет использования вспомогательных целевых белков и

молекулярных адъювантов (Lee et al., 2004), одним из которых является субъединица Б рицина клещевины (*Ricinus communis*). Как было показано Лиу с соавторами, рекомбинантная субъединица Б рицина стимулирует иммунную систему животных, участвуя в активации Т-лимфоцитов и макрофагов и оказывает положительный эффект на иммуномодулирующую активность антигенов (Liu et al., 2013). Таким образом, проблема получения съедобной вакцины растительного происхождения против вируса гриппа птиц широкого спектра действия является актуальной как для практического применения, так и с точки зрения развития фундаментальных аспектов молекулярной биотехнологии.

Целью данного исследования являлась разработка растительной экспрессионной системы для получения вакцинных белков ветеринарного назначения на примере пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1. В связи с целью были поставлены **задачи**:

1. Изучить возможность экспрессии пептида М2е отдельно и в трансляционном слиянии с β - глюкозидазой в стабильно трансформированных растениях;
2. Клонировать нуклеотидную последовательность субъединицы Б рицина (RTB) для использования в качестве мукозального адъюванта;
3. Получить трансгенные растения табака и ряски малой, экспрессирующие пептид М2е в трансляционном слиянии с субъединицей Б рицина;
4. Провести количественный анализ экспрессии слитого белка RTB-М2е в трансгенных растениях табака и ряски.

Научная новизна работы. Данная работа посвящена разработке подхода к получению вакцины против гриппа птиц широкого спектра действия на основе растительных платформ. Нами был изучен характер экспрессии синтетического 5'-концевого фрагмента гена М2 вируса гриппа птиц H5N1, включающего пептид М2е, с оптимизированным для растений кодонным составом в трансгенных растениях. Впервые были получены трансгенные растения табака и ряски стабильно экспрессирующие последовательность пептида М2е. Были показаны различия в экспрессии М2е в составе N-концевых фрагментов белка М2 вируса гриппа птиц H5N1 разной длины в трансляционном слиянии с β - глюкозидазой в трансгенных

растениях табака. Было показано, что оптимальными для экспрессии в растениях являются фрагменты длиной 30 а.о. (M130) и 22 а.о. (M122), тогда как экспрессия фрагмента в 43 а.о. (M143) в составе слитого белка прекращается в процессе культивирования.

Для последующего использования в качестве мукозального адъюванта нами была клонирована последовательность субъединицы Б рицина (RTB) из местного сорта клещевины (*Ricinus communis*), проведенный анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей показал идентичность клонированной RTB последовательностям, депонированным в базе данных GeneBank. Полученная последовательность RTB была клонирована в трансляционном слиянии с пептидом M2e. Было показано, что в трансгенных растениях табака и ряски в составе слитого с пептидом M2e белка рекомбинантная субъединица Б рицина сохраняла способность связывания с галактозосодержащими субстратами, что указывало на корректность посттрансляционных модификаций и сохранение её адъювантных свойств. Был проведен количественный анализ накопления слитых белков M130-β – глюкуронидаза и RTB-M130 в трансгенных растениях. Было показано, что уровень накопления M130-β – глюкуронидаза в трансгенных растениях ряски значительно превосходил таковой в растениях табака, тогда как накопление RTB-M130 достоверно не отличалось в двух изученных экспрессионных системах.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенная нами работа позволила отобрать оптимальный для экспрессии в растениях табака и ряски 5'-концевой фрагмент гена M2 вируса гриппа птиц H5N1, включающий пептид M2e. В результате были получены линии стабильно трансформированных трансгенных растений табака и ряски, синтезирующих пептид M2e вируса гриппа птиц H5N1, слитый с β- глюкуронидазой и субъединицей Б рицина, которые могут быть использованы как экспрессионные платформы для получения соответствующих вакцинных белков. Полученные результаты будут использованы в дальнейших исследованиях по разработке съедобной противогриппозной вакцины широкого спектра действия ветеринарного назначения.

Методология и методы диссертационного исследования. Диссертационная работа выполнена с использованием современного оборудования, классических и современных методик культивирования растительных клеток, генетической инженерии и молекулярно-биологических методов анализа.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. В трансгенных растениях табака и ряски происходит стабильная экспрессия синтетического 5'-концевого фрагмента гена M2 вируса гриппа птиц H5N1, включающего пептид M2e, с оптимизированным для растений кодонным составом.

2. В трансгенных растениях табака уровень накопления N-концевой последовательности белка M2 в трансляционном слиянии с β -глюкуронидазой зависит от размера экспрессируемых 5'-концевых фрагментов гена M2.

3. В трансгенных растениях ряски, экспрессирующих слитую последовательности пептида M2e - β -глюкуронидаза, накопление целевого белка составляет до 2% от общего растворимого белка.

4. В трансгенных растениях табака и ряски показана стабильная экспрессия слитой последовательности, состоящей из клонированной из клещевины (*Ricinus communis*) нуклеотидной последовательности субъединицы Б рицина (RTB), используемой в качестве перорального адьюванта, и пептидом M2e.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертации были представлены на следующих научных мероприятиях: 3-я международная конференция «PLANT EXPRESSION SYSTEMS FOR PHARMACOLOGICS» (University of Verona, Italy, 2009); 15-я, 17-я Международные Пущинские школы-конференции молодых ученых «Биология-наука 21-го века» (г. Пущино, 2011, 2013); X чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова, (Москва, 2011); Всероссийская молодежная конференция «Актуальные проблемы химии и биологии» (Пущино, 2012); Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений» (г. Минск, 2013); V Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (г. Ростов-на-Дону, 2013);

Международная конференция «MUCOSAL VACCINES ADJUVANTS & DELIVERY 2013» (Copenhagen, Denmark, 2013); Международная научная конференция по биологии и биотехнологии растений (Алматы, Казахстан, 2014); Международный конгресс «INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR PLANT BIOTECHNOLOGY 2014» (Melbourne, Australia, 2014). По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 3 в реферируемых научных журналах (из списка ВАК) и 10 в сборниках тезисов конференций.

1 Обзор литературы.

1.1 Растения как платформа для биофарминга.

Приоритетным направлением развития современной биотехнологии является использование растительных систем в качестве биофабрик по производству веществ различного функционального назначения, в том числе белков - «биофарминг». Потребность в рекомбинантных белках существует в различных отраслях промышленности, в медицине и ветеринарии, а так же в научных исследованиях. Некоторые из них, такие как мажорные белки крови или коллаген, удается получить, не прибегая к сложным биотехнологическим процессам, например из донорской крови или отходов мясоперерабатывающей промышленности, однако большое количество востребованных белков на практике сложно выделить в чистом виде. В подобных случаях прибегают к биотехнологической наработке этих соединений. В настоящее время существует множество разнообразных экспрессионных систем, использующих широкий спектр организмов от бактерий до клеток животных *in vitro*. Выбор системы во многом зависит от специфики интересующего белка. Некоторые сравнительно небольшие белки, такие как Fv фрагменты иммуноглобулинов, используемые при терапии различных заболеваний, традиционно производятся в прокариотических экспрессионных системах (Schmidt and Skerra, 1994). Для более сложноорганизованных белков такой подход невозможен по ряду причин. Во-первых, в бактериальных системах трудно получить биологически активные белки животного происхождения, поскольку процессы посттрансляционных модификаций белков бактерий и эукариот существенно отличаются. Во-вторых, кодонный состав генов эукариот имеет свои особенности, и многие гены перед экспрессией в бактериях требуют серьезной оптимизации, что зачастую невозможно без изменения аминокислотной последовательности (Twyman et al., 2005).

Более перспективными, по сравнению с прокариотическими, предстают экспрессионные системы, основанные на использовании дрожжей, имеющих

эукариотический белоксинтезирующий аппарат и биохимию. Однако белки, получаемые в таких системах, не удовлетворяют требованиям биоидентичности, так как не подвергаются корректным посттрансляционным модификациям, что в значительной степени влияет на возможность использования такого продукта в терапии или профилактики заболеваний (Chiba et al., 1998).

В некоторых случаях используются гибридные технологии и методы экспрессии белков в культуре клеток животных. Такие белки, как моноклональные антитела, получить иным способом невозможно, поскольку антитела являются эффекторными молекулами иммунной системы животных, обладающими сложной структурой и определенным характером гликозилирования. Все этапы котрансляционного и посттрансляционного процессинга антител правильно проводятся только В-клетками, синтезирующими антитела в организме, а также гибридами. В большинстве других систем эти процессы идут по иному пути и влекут за собой изменения в структуре белка, сопровождающиеся потерей его активности, появлением пирогенного или иммуногенного эффекта и другими перестройками, что делает такие молекулы непригодными для использования (Wurm, 2004).

Интерлейкины, опухолевые маркеры, поверхностные рецепторы и подобные молекулы, являются белками, трудными для получения в больших количествах, поскольку многие из них являются минорными поверхностными факторами иммунокомпетентных клеток, которые также представляют собой минорную фракцию клеточного состава крови. Значение этих молекул очень велико как в фундаментальном, так и в практическом применении. К примеру, интерлейкины могут успешно применяться в химиотерапии некоторых видов рака (Anaissie et al, 1996), трансплантациях клеток костного мозга (Armitage, 1998), поэтому проблема наработки подобных соединений является одной из актуальных.

Таблица 1 - Сравнение основных характеристик различных экспрессионных систем (по Fischer and Emans, 2000)

| | Трансгенные растения | Растительные вирусы | Дрожжи | Бактерии | Клетки млекопитающих | Трансгенные животные |
|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Стоимость/ условия хранения | дешево/ комнатная температура | дешево/ –20°C | дешево/ –20°C | дешево/ –20°C | дорого/ азот | дорого |
| Размер клонируемых генов | не ограничен | ограничен | неизвестно | неизвестно | ограничен | ограничен |
| Гликозилирование белков | точное** | точное** | неточное | отсутствует | точное | точное |
| Многокомпонентные белковые комплексы | возможно | невозможно | невозможно | невозможно | невозможно | возможно |
| Стоимость производства | низкая | низкая | низкая | низкая | высокая | высокая |
| Масштабы производства | общемировые | общемировые | ограничены | ограничены | ограничены | ограничены |
| Точность сворачивания белка | высокая ** | высокая ** | средняя | низкая | высокая | высокая |
| Количественный выход продукта | высокий | очень высокий | высокий | средний | средний | высокий |
| Терапевтический риск* | неизвестен | неизвестен | неизвестен | присутствует | присутствует | присутствует |

* –остатки вирусных последовательностей, онкогены, эндотоксины; ** – требует дополнительных исследований.

Ряд ограничений бактериальных систем, а также высокая стоимость биосинтеза белков в клетках млекопитающих вызвали необходимость исследования растений в качестве дешевой, безопасной и эффективной альтернативы (Fischer and Emans, 2000). Как представлено в таблице 1, растительные экспрессионные системы обладают рядом преимуществ перед биосистемами, основанными на использовании микробных и животных клеток. Во-первых, несмотря на то, что физиология и биохимия высших растений высокоспециализирована, механизмы, связанные с экспрессией генов, во многом ближе к животным, нежели к бактериям и грибам. Растения имеют более близкий к животным белоксинтезирующий аппарат, а также пути котрансляционных и посттрансляционных модификаций, в частности, гликозилирования, являющихся необходимой стадией синтеза белков. Поэтому растительные экспрессионные системы позволяют синтезировать животные белки, практически не изменяя их свойств. Во-вторых, создание различных генных конструкций позволяет синтезировать рекомбинантный белок в определенных компартментах растительной клетки, что обеспечивает сохранность и простоту выделения целевого продукта. В-третьих, уже имеются высокоэффективные технические способы переработки и культивирования растений в промышленных масштабах. В - четвертых, риск для здоровья людей, возникающий при контаминации потенциальными патогенами, сводится к минимуму, и в пятых, производство белков в растениях не требует сложных и дорогостоящих биореакторов, необходимых в микробиологической промышленности, что существенно снижает стоимость конечного продукта (Fischer and Emans, 2000).

В последнее десятилетие экспрессионные системы на основе растений широко используются при производстве рекомбинантных пептидов различного назначения. Первые рекомбинантные белки растительного происхождения, такие как авидин (Hood et al., 1997), эритропоэтин, β - глюкоуронидаза (Witcher et al., 1998) уже вышли на рынок и прочно заняли достойную нишу. В таблице 2 приведен перечень некоторых фармацевтически значимых белков, синтезированных в растительных системах и находящихся на различных стадиях коммерческого внедрения.

Таблица 2 - Степень коммерциализации некоторых фармацевтически значимых протеинов, синтезированных в растениях (по Paul M. and Ma J., 2011, с дополнениями)

| Продукт | Назначение | Применение | Коммерческая организация | Растительная культура | Стадия внедрения | Ссылки |
|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|---|----------------------------|--|--|
| Аро-А1Milano | терапевтический белок | Сердечно-сосудистые заболевания | SemBioSys Genetics, (Canada) Plantechno srl. (Vicomoscano, Cremona, Italy) | сафлор рис | Пре-клиническая по состоянию на март 2010 г патент на территории США US2010/0168006A1 | http://www.sembiosys.com http://www.plantechno.com |
| инсулин (SBS-1000) | терапевтический белок | диабет | SemBioSys Genetics | сафлор | Фазы I/II завершены. | Nykiforuk et al., 2006 |
| глюкоцереброзидаза (UPLYSO) | фермент | Болезнь Гоше | Protalix (Carmiel, Israel) | культура клеток моркови | Фаза III завершена в 2009 г. | Aviezer et al., 2009 Zimran et al., 2011 http://www.protalix.com |
| α - галактозидаза (PRX-102) | фермент | Болезнь Фабриса | Protalix | культура клеток моркови | Пре-клиническая | см. вебсайт компании |
| Ацетилхолинэстераза (PRX-105) | фермент | биозащита | Protalix | культура клеток моркови | Фаза I к 2010 г. | см. вебсайт компании |
| Фактор некроза опухоли (Pr-anti-TNF) | антитело | артрит | Protalix | культура клеток моркови | Пре-клиническая | см. вебсайт компании |
| β -глюкозидаза | Терапевтический белок | Болезнь Гоше | Plantechno srl TransPharma srl | семена табака табак | Пре-клиническая Фаза I | см. вебсайт компаний |

| Продукт | Назначение | Применение | Коммерческая организация | Растительная культура | Стадия внедрения | Ссылки |
|--|-----------------|------------------------------------|---|--|---|---|
| 2G12 IgG | антитело | HIV профилактика | Pharma-planta consortium | табак | Фаза I | http://www.pharma-planta.org |
| Модифицированный α -интерферон (Locteron R) | цитокинин | Лечение гепатита С | Biolex Therapeutics (Pittsboro, USA) | ряска | Фаза II (по состоянию на апрель 2009 года) | http://www.biolex.com |
| Рекомбинантный плазмин (BLX-155) | фермент | Профилактика тромбозов | Biolex Therapeutics | ряска | Пре-клиническая | См. вебсайт компании |
| Anti-CD20 mAb (BLX-301) | антитело | Лечение лимфомы Ходжкинса | Biolex Therapeutics | ряска | Пре-клиническая | Cox et al., 2006 |
| Лактоферрин | пищевая добавка | GI инфекции у детей | Ventria Bioscience (USA) Meristem therapeutics | рис кукуруза | одобрено к применению FDA Фаза I | http://www.ventria.com См. вебсайт компании |
| Лизоцим | пищевая добавка | GI инфекции у детей | Ventria Bioscience | рис | одобрено к применению FDA | Yang et al., 2003 |
| RhinoRx | антитело | Профилактика риновирусных инфекций | Planet Biotechnology (USA) | листья табака | Фаза II | http://www.planetbiotechnology.com |
| Guy's 13 SIgA (CaroRx) | антитело | кариес | Planet Biotechnology | листья табака | Фаза II | См. вебсайт компании |
| вакцины против вируса гриппа | вакцина | защита от эпидемий | Medicago (Canada) | Proficia TM <i>N.benthamiana</i> | Фаза II к 2010 г | http://www.medicago.com |

| Продукт | Назначение | Применение | Коммерческая организация | Растительная культура | Стадия внедрения | Ссылки |
|--|------------|--------------------------|---|--|------------------------------|---|
| Поверхностный антиген гепатита В | вакцина | гепатит В | Arntzen group, (Arizona State University) Thomas Jefferson University/Polish NAS (Posnan, Poland) | Картофель салат-латук | Фаза I Фаза I | Thanavala et al., 2005 Kapusta et al., 1999 |
| Различные анти-идиотипы иммуноглобулинов IgG | вакцина | Лечение лимфомы Ходкинса | Bayer Innovation (Halle, Germany) | MagnICON Инфильтраты <i>N.benthamiana</i> | Фаза I (с декабря 2009 года) | http://www.bayer-innovation.com |
| Белок капсида вируса Норвалка | вакцина | Норовирусная вакцинация | Arntzen group, Arizona State University | картофель | Фаза I | Tacket et al., 2000 |

В настоящее время для производства рекомбинантных белков растительного происхождения преимущественно использовали табак (*Nicotiana spp.*), синтезируя целевой продукт в листьях. Такая популярность отражает статус табака как устоявшейся экспрессионной платформы, для которой разработаны надежные методики трансформации и контроля экспрессии чужеродных генов. Кроме того, высокий выход биомассы и возможность быстрого масштабирования производства делают табак хорошим объектом для коммерческого использования в сельском хозяйстве. Поскольку табак относится к непродовольственным и не кормовым культурам, его использование в производстве рекомбинантных белков практически исключает риск загрязнения кормовых сельскохозяйственных растений трансгенным материалом (Stoger et al., 2000). Табак был принят в качестве биосинтетической платформы несколькими биотехнологическими компаниями, в том числе Planet Biotechnology Inc. (<http://www.planetbiotechnology.com/>) и Meristem Therapeutics (<http://www.meristem-therapeutics.com/>). В настоящее время эти компании запустили фазу-II клинических испытаний нескольких целевых белков, синтезированных с помощью табака.

Одним из недостатков табака является высокое содержание никотина и других токсичных алкалоидов, которые приходится удалять в процессе производства, что увеличивает конечную стоимость получаемых рекомбинантных продуктов. В последнее время в качестве платформ для производства фармацевтически значимых белков используются сорта табака с низким содержанием алкалоидов, а также иные растительные культуры, такие как рис, соя, клевер, люцерна, картофель, томат и другие (Fischer et al., 2004; Jelaska et al., 2005). В таблице 3 собраны сведения о достоинствах и недостатках экспрессионных платформ на основе различных растительных видов.

Таблица 3 - Растения, преимущественно используемые в биофармации.

| Виды растений | Преимущества | Недостатки |
|--|--|---|
| Модельные растения: Арабидопсис | Широкий диапазон доступных мутантов, расшифрованный геном легкость трансформации | Не используется для коммерческого культивирования |
| Листовые культуры: табак | Высокий выход биомассы, разработанные технологии трансформации и стабильной экспрессии рекомбинантных генов | Низкое содержание общего белка, присутствие алкалоидов низкая стабильность рекомбинантных белков в листьях |
| люцерна, клевер | Высокий выход биомассы, разработанные технологии клонального размножения, высокое содержание общего белка | Низкая стабильность рекомбинантных белков, присутствует щавелевая кислота |
| Зерновые культуры: кукуруза, рис | Стабильность рекомбинантных белков в течение хранения (в семенах), относительная простота в получении трансгенных растений | Рис- сложность культивирования; кукуруза - перекрестное опыление |
| пшеница, ячмень | Стабильность рекомбинантных белков в течение хранения (в семенах) | Низкий выход продукта, трудности при получении трансгенных растений |
| Бобовые: соя, горох, голубиный горошек | Высокое содержание общего белка, синтез рекомбинантных белков в бобах | Трудности при получении трансгенных растений |
| Овощные и плодовые культуры: картофель | Съедобен, повсеместно распространен, рекомбинантные белки стабильны в процессе хранения | Необходима термическая обработка |
| томат, морковь, банан | Съедобны, возможно круглогодичное производство | Требуют специальных условий хранения, низкий выход целевого продукта |
| Рясковые: ряска малая (<i>Lemna minor</i>), ряска горбатая (<i>Lemna gibba</i>), вольфия (<i>Wolffia arrhiza</i>) | Нетребовательность к питательной среде, клональное размножение, высокое содержание общего белка, высокая экологическая безопасность при культивировании в замкнутых системах (биореакторы различных типов) | Трудности при получении трансгенных растений |
| Простые растения: мох (<i>Physcomitrella patens</i>), одноклеточные водоросли. | Нетребовательность к питательной среде, клональное размножения, выделение продукта в среду, высокая экологическая безопасность при культивировании в замкнутых системах (биореакторы) | Наличие специфических систем посттрансляционных модификаций белков; мох – трудности масштабирования |

В последние пять-семь лет, рядом авторов ряска малая (*Lemna minor* L.) рассматривается как перспективный объект для биофарминга, чему способствует такие особенности ряски как высокая скорость роста (время удвоения биомассы от 36 часов), преобладание вегетативного размножения и высокое содержание общего белка (до 45% от сухой массы). Основные физиологические и биохимические параметры рясковых рассмотрены в следующей главе.

1.2 Общая характеристика *Lemna minor* L.

Ряска малая (*Lemna minor* L.) – однодольное покрытосеменное растение семейства рясковых (*Lemnaceae*), относится к роду *Lemna*, который насчитывает до 37 видов (Stomp, 2005). Ряска распространена по всему земному шару, на территории нашей страны встречается повсеместно. Ряска – одно из наиболее редуцированных цветковых растений, с отсутствующим расчленением на стебель и лист, представляющее собой листец с корнем и боковыми пластинчатыми побегами (Stomp, 2005). Проводящая система у рясковых практически отсутствует, корни слабо развиты, не достигают грунта, и выполняют главным образом функции якоря, предотвращающего переворачивание растений в воде (Landolt and Kandeler, 1987). Листецы ряски – плавающие фотосинтезирующие органы размером до 2-3 мм в диаметре. Новые листецы образуются из меристематических зон материнского листеца, от которого отделяются в процессе формирования (Landolt, 1986, 1998).

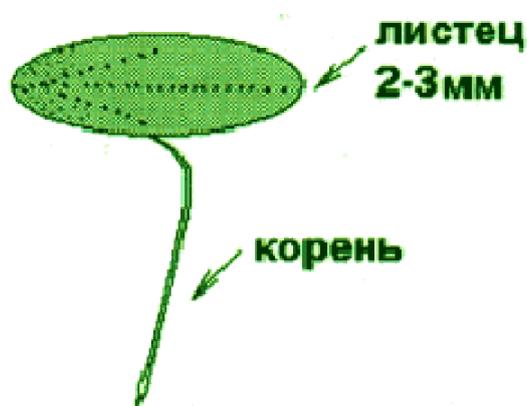


Рисунок 1 - Общий вид растения Ряски малой - *Lemna minor*.

Форма листецов может быть разной: почковидная, округлая, эллиптическая, ланцетная, линейная, шаровидная и овальная (Hillman, 1961). Срединная часть листеца ряски расщеплена двумя боковыми кармашками, в которых закладываются вегетативные почки, дающие начало дочерним листецам при вегетативном размножении. Иногда в одном из кармашков развивается крошечное соцветие, состоящее из двух тычиночных и одного пестичного цветков. Околоцветник отсутствует. Мужские цветки состоят из одной, редко двух тычинок размером около 1мм. Завязь яйцевидная, одногнездная, с 1-6 семязачатками; столбик короткий и тонкий, рыльце расширено в форме неглубокой воронки или чаши с неровными краями (Иванова, 1987). Цветет ряска обычно в июне – августе, иногда в конце мая или в сентябре. С момента заложения цветущего листеца до окончания процесса цветения проходит около 20 дней. Для всех рясковых характерна протогония, то есть вначале созревает рыльце женского цветка, затем тычинка второго цветка (Landolt, 1998). Однако основным способом размножения ряски является вегетативное деление. Интенсивный рост происходит с июня по август, растения удваивают массу за 1 - 6 суток, удвоение количества листецов происходит за 2 - 3 суток (Landolt and Kandeler, 1987).

Рясковые содержат в среднем около 45% белка от сухой массы, остальное приходится на углеводы, липиды и прочие компоненты (Porath et al., 1979). Белок рясковых отличается высокими потребительскими свойствами – за исключением метионина, цистеина и триптофана он содержит все необходимые для питания аминокислоты в количествах, соответствующих нормам Всемирной продовольственной и сельскохозяйственной организации (ФАО). По содержанию необходимых аминокислот рясковые превосходят такие продовольственные культуры, как кукуруза и рис. Белки рясковых обогащены лизином, аргинином, аспарагиновой и глутаминовой кислотами. Рясковые богаты витаминами А1, В1, В2, В6, С, и особенно витаминами Е (около 0,5 мг/г сухого веса) и РР (0,8 мг/г сухого веса) (Demanjı, 1993).

В настоящее время область коммерческого использования ряски довольно широка и включает в себя: изготовление биодобавок к пище и кормов для домашних животных (Haustein et al., 1994), выделение стероидов (Kaihara and Takimoto, 1991) и других фармакологически активных веществ (Mesmar and Abussaud, 1991). Рясковые также могут использоваться в качестве биоиндикаторов, поскольку весьма чувствительны к загрязняющим окружающую среду агентам (Holst and Ellwanger, 1982; Jenner and Janssen, 1993). Способность к быстрому вегетативному размножению в сочетании с высоким содержанием белка является существенным преимуществом семейства рясковых по сравнению с другими растениями, что открывает перспективы использования ряски в биотехнологической индустрии (Goopy et al., 2003; Gasdaska et al., 2003).

1.3 Генетическая трансформация ряски

Первые сообщения о генетической трансформации растений семейства рясковых были сделаны в 1991 году (Rolfe and Tobin, 1991). Используя баллистическую трансформацию и интактные обесцвеченные листецы *Lemna gibba*, исследователи разработали методику транзientной экспрессии чужеродных генов и использовали её для изучения экспрессии гена фитохрома под *rbcS* промотором, изолированным из *L. gibba*. В 1992 году Стомп с сотрудниками начали работу по разработке методов стабильной генетической трансформации *L. gibba*, с использованием различных штаммов *Agrobacterium tumefaciens*. Полученные данные показали высокий уровень транзientной экспрессии маркерного гена β-глюкуронидазы (GUS) в растениях (Stomp et al., 1998). В последующих экспериментах были изучены факторы, необходимые для оптимизации непосредственной трансформации листецов и получения стабильно трансформированных растений. К этим факторам относились: среда для роста бактерий; бактериальный титр для кокультивации с растениями в жидкой среде; обработка листецов перед трансформацией; время инокуляции; время и условия кокультивации; рост после кокультивации и условия отбора трансформантов (Moon

et al., 1997). В результате оптимизации методики была получена высокая частота транзиентной экспрессии. Однако стабильно трансформированных листочков в этих экспериментах получено не было. Неудачи в получении трансгенных растений ряски прямо из листочков привели к использованию более сложного метода, с использованием каллусных культур, отбора трансформированного каллуса с последующей регенерацией растений из селективированных каллусных линий. Одним из важных результатов использования такого подхода стало развитие методик получения каллуса из листочков и выделения отдельных линий (Frick, 1991). В последующем полученные каллусные культуры использовали для агробактериальной и баллистической трансформации. Этот подход был успешно применен в двух независимых лабораториях (Edelman et al., 1998; Yamamoto et al., 2001). Методом отбора трансформированного каллуса были получены трансгенные листочки *L. minor* и *L. gibba*. В лаборатории под руководством Стомп были получены несколько линий *L. minor*, содержащие GUS-конструкции с генами различных селективных маркеров. В последующем были запатентованы методики агробактериальной (Yamamoto et al., 2001) и баллистической (Stomp et al., 1998) трансформации каллусных культур *L. gibba* и *L. minor*. Полученные результаты по генетической трансформации рясковых позволили американской фирме Биолекс (Bioplex Therapeutics, Pittsboro, NC, USA) организовать производство таких фармацевтически ценных белков как α -интерферон, рекомбинантный плазмин BLX-155 и антитела против цитокина CD20 на основе экспрессии соответствующих рекомбинантных генов в растениях ряски (таблица 2).

1.4 Рекомбинантные вакцины растительного происхождения

Достижения в области молекулярной биологии, микробиологии и иммунологии привели к новым подходам к разработке вакцин против болезней, вызывающих массовые эпидемии среди животных и людей. Получение вакцин с использованием лабораторных животных является дорогостоящим и трудоемким процессом, требующим большого количества времени и сопряженного с серьезной

опасностью при работе с патогенами. Альтернативным способом получения вакцин может считаться синтез белков патогенов в биотехнологических системах, например, растительных (Rybicki, 2010). Узнавание антигенных белков патогенов иммунной системой животных требует наличия определенных эпитопов. Растительные пути котрансляционных и посттрансляционных модификаций белков, в том числе гликозилирования, сходны с животными. Поэтому рекомбинантные белки, синтезированные в растениях могут быть в достаточной степени иммуногенными, чтобы вызывать защитный эффект при введении животному (Медуницын Н.В., 1999).

Слизистая оболочка млекопитающих является важным местом проникновения патогенов, в частности, бактерий и вирусов. Традиционная парентеральная вакцинация менее эффективно обеспечивает защиту от кишечных и респираторных заболеваний. Считается, это происходит отчасти потому, что системная вакцинация является плохим индуктором мукозального (барьерного) иммунитета, способного замедлить или остановить проникновение инфекции до включения основного иммунного ответа. Мукозальная иммунная система осуществляет основную защиту слизистых оболочек, выстилающих пищеварительные, дыхательные и мочеполовые тракты. В состав этой системы включают группу организованных лимфоидных тканевых структур, обозначаемых как MALT. MALT подразделяют на несколько структур, таких как кишечник - ассоциированные лимфоидные ткани (GALT), лимфоидные ткани, связанные с носоглоткой, и бронхиально - ассоциированные лимфоидные ткани (Thanavala et al., 2010). К структуре GALT относят Пейеровы бляшки - большой кластер лимфоидных фолликул, являющихся местом индукции мукозального иммунитета. В состав Пейеровых бляшек входят специализированные эпителиальные М-клетки, осуществляющие транспорт интактных макромолекул и микроорганизмов через эпителиальный барьер непосредственно к субэпителиальным дендритным клеткам (DC), презентующим антигены Т-клеткам, находящимся в смежных со слизистыми оболочками областях (Neutra et al., 2006). М-клетки образуют инвагинации или

«карманы» в базолатеральной плазматической мембране, которые содержат Т- и В-лимфоциты и дендритные клетки. Интактные молекулы антигенов в этих «карманах» подвергаются трансцитозу и переносятся в антиген- процессивные и антиген - презентующие клетки, стимулирующие выработку секреторных иммуноглобулинов класса А (IgA) (Takahashi et al., 2009). Пейеровы бляшки также содержат популяцию В-клеток, синтезирующих IgG - основные иммуноглобулины сыворотки крови. Таким образом, в течение мукозальной вакцинации в тканях слизистых оболочек может производиться и локальный синтез IgG (Mason et al., 2002).

Стимулирование мукозального иммунного ответа лучше всего достигается путем прямой доставки вакцины к поверхности слизистой оболочки. Кроме того, вакцины, доставленные подобным образом, могут вызывать гуморальный и клеточный ответ специфической иммунной системы и доставляют меньше дискомфорта и боли, чем парентерально вводимые препараты. По определению Криппс с соавторами (Cripps et al., 2001), успех мукозальной иммунизации зависит от следующих критериев: эффективной доставки антигена к месту индукции мукозального иммунитета (например, к Пейеровым бляшкам лимфоидных тканей кишечника); усиления действий антигенов с использованием мукозальных иммуномодуляторов, таких как бактериальные энтеротоксины и цитокины; от выбора режима и способа иммунизации, которые приведут к максимальному стимулированию защитных реакций в желаемой части слизистой оболочки.

Вакцины растительного происхождения представляют собой альтернативу традиционно получаемым вакцинам, поскольку сочетают в себе безопасность и эффективность, а также способствуют пероральному применению за счет потребления в пищу растительной ткани (Thanavala et al., 2005). Трансгенные растения являются идеальным средством для получения съедобных вакцин, так как жесткие стенки растительной клетки обеспечивают защиту антигенных белков в кислой среде желудка, что позволяет антигенам в интактном виде достигнуть лимфоидной ткани кишечника. Кроме того в отличие от субъединичных вакцин,

полученных на основе прокариотических систем, антигенные детерминанты растительного происхождения, как правило, не требуют дополнительного процессинга для перехода в активную форму, поскольку в растительной клетке осуществляются посттрансляционные модификации белков, общие для эукариотических клеток (Hefferon, 2010). Особенно актуально производство вакцин растительного происхождения для нужд ветеринарной медицины, где одним из главных требований (помимо эффективности) является низкая стоимость конечного продукта. К настоящему времени на основе экспрессии в растительных системах антигенных детерминант ряда инфекционных возбудителей разработано несколько десятков вакцин ветеринарного и медицинского назначения. В таблице 4 представлены некоторые примеры потенциальных вакцин растительного происхождения, пригодных для профилактики и лечения ряда вирусных и бактериальных заболеваний домашних животных.

Считается, что основным недостатком растений как биосинтетических платформ является относительно низкий выход рекомбинантного белка. Анализ данных представленных в таблице 4 показывает, что в большинстве случаев уровень накопления рекомбинантного протеина находится в диапазоне от 2-3 до 40-50 мг на грамм сырого веса растительной массы, что соответствует нескольким десяткам процента от общего растворимого белка. Например, количество синтезируемого в листьях картофеля белка F вируса болезни Ньюкастла птиц составляло 0,3 мг на грамм общего растворимого белка (Berinstein et al., 2005), а количество антигенов V и F1 бубонной чумы *Yersinia pestis*, синтезируемых в культуре корней табака - 45 нг на грамм сухого веса (Woffenden et al., 2008). Необходимо отметить, что полученные в этих экспериментах уровни накопления антигенов были достаточны для иммунизации лабораторных животных против соответствующих патогенов.

В последние годы разработаны новые технологии, позволяющие увеличивать накопление гетерологичного антигена в трансгенных растениях (Rigano et al., 2005). К таким технологиям относятся оптимизация для растений кодонного состава рекомбинантных генов, использование в генетических конструкциях

дополнительных регуляторных элементов, повышение стабильности синтезированных пептидов за счет накопления в определенных компартментах растительной клетки, запасующих органах растений и т.д. (He et al., 2008). Например, в работе Лоза-Рубио с соавторами уровень накопления в зернах кукурузы домена G поверхностного гликопротеина вируса бешенства составлял порядка 1% от общего растворимого протеина (Loza-Rubio et al., 2008). В работе Зоу с соавторами содержание гликопротеина S1 вируса инфекционного бронхита птиц в клубнях картофеля составило более 2-х грамм на килограмм сухого веса (Zhou et al., 2003, 2004).

Другим подходом к повышению количества рекомбинантного белка является его экспрессии в хлоропластах растений. Так, рядом авторов было показано, что при экспрессии рекомбинантных белков в хлоропластах табака уровень накопления целевых продуктов составлял 4,5-14% от тотального растворимого белка для защитного антигена PA *Bacillus anthracis* (Koya et al., 2005) и 22,6% TSP для белка оболочки парвовируса собак (Molina et al., 2004, 2005). Однако такой подход годиться не для всех антигенных детерминант, поскольку рекомбинантные белки, синтезированный в хлоропластах могут быть недостаточно иммуногенными, чтобы оказывать защитный эффект при введении животному. Это определяется тем, что в хлоропластах экспрессия и посттрансляционные модификации протеинов протекают по прокариотическому типу, что приводит к недостаточной иммуногенности рекомбинантного белка (McDonald et al., 2005; Hefferon, 2010).

Иммуногенность субъединичных вакцин растительного происхождения может быть увеличена за счет использования различного рода адъювантов и вспомогательных целевых белков. Например, как показано Ли с соавторами (Lee et al., 2004), содержание рекомбинантного антигена CFA/I *E. coli* штамма K99 в клубнях картофеля в количестве 0,0006–0,002% от общего растворимого белка в сочетании с субъединицей B холерного токсина приводит при пероральном введении к иммунизации мышей против CFA/I.

Таблица 4 - Потенциальные вакцины ветеринарного назначения, полученные с использованием стабильно трансформированных растений (по Floss et al., 2007, с дополнениями)

| Патоген/хозяин | Антиген | Растительная система | Уровень экспрессии | Эффективность | Ссылки |
|--|--|----------------------|---|--|---------------------------|
| Сибирская язва <i>Bacillus anthracis</i> Животные, человек | Защитный антиген РА | Хлоропласты табака | 4,5–14,2% TSP | Подкожная иммунизация мышей | Koya et al., 2005 |
| Парвовирус собак (CPV) собаки | Белок оболочки VP2 (2L21 пептид) слитый с GFP или субъединицей Б холерного токсина | Хлоропласты табака | 22,6% TSP (GFP-2L21) 1,1% TSP (СТВ-2L21) | Парентеральная и оральная иммунизация мышей, подкожная иммунизация кроликов (СТВ-2L21), максимально возможный ответ (GFP-2L21) | Molina et al., 2004, 2005 |
| Бычий ротавирус Крупный рогатый скот | VP8 фрагмент белка оболочки VP4 | Хлоропласты табака | 600 мкг/г сырой ткани | Растительный экстракт вызывал сильный иммунный ответ, иммунизированные мыши стали устойчивы к заражению ротавирусом | Lentz et al., 2011 |
| | Белок оболочки VP4 (пептид eBRV4a) слитый с β- глюкоуридазой | Люцерна | 0,4–0,9 мг/г TSP (измерено по активности GUS) | Оральная и парентеральная иммунизация мышей, защита потомства иммунизированных мышей | Wigdorovitz et al., 2004 |
| Кроличий папилломавирус (CRPV), кролики | Белок оболочки L1 | Табак | 0,4–1,0 мг/кг FW | Оказывает иммуногенное действие при подкожном и внутримышечном введении, не предотвращает роста папиллом | Kohl et al., 2006 |

| Патоген/хозяин | Антиген | Растительная система | Уровень экспрессии | Эффективность | Ссылки |
|---|---|----------------------|-----------------------------------|--|-------------------------------|
| Foot-and-Mouth-Disease Virus (FMDV) Парнокопытные животные | Полипротеин P1 и протеаза 3C (P1-3C) | Люцерна | 0,005–0,01% TSP | Оказывает иммуностимулирующее и защитное действие у мышей при внутрибрюшинном введении | Dus Santos et al., 2005 |
| | Структурный белок VP1 (VP21эпитоп) слитый с коровым белком гепатита В (HBcAg) | Табак | 0,05% TSP | Иммуногенное и защитное действие у мышей при внутрибрюшинном введении | Huang et al., 2005 |
| Вирус инфекционного бронхита птиц (IBV) | Гликопротеин S1 | Клубни картофеля | 0,07–0,22 % TSP. 2,39–2,53мг/г FW | Пероральная иммунизация цыплят | Zhou et al., 2003,2004 |
| Вирус болезни Ньюкастла (NDV) птицы | белок F, слитый с гемагглютинином/нейраминидазой HN | Листья картофеля | 0,3–0,6 мг/г TSP | Пероральная иммунизация мышей | Berinstein et al., 2005 |
| | Белок F | Семена кукурузы | 0,9–3,0% TSP | Пероральная иммунизация цыплят | Guerrero-Andrade et al., 2006 |
| Вирус бешенства домашние и дикие животные, человек | Домен G поверхностного гликопротеина | Табак | 0,001–0,38% TSP | Иммуногенное и защитное воздействие на мышей при внутрибрюшинном введении | Ashraf et al., 2005 |
| | Домен G поверхностного гликопротеина | Зерна кукурузы | 1% TSP | Защитное воздействие на мышей при введении в корм трансгенного зерна | Loza-Rubio et al., 2008 |
| | Полноразмерный гликопротеин G+N | Томат | 1-5% TSP | Защитное воздействие на мышей растительного экстракта | Perea Arango et al., 2008 |

| Патоген/хозяин | Антиген | Растительная система | Уровень экспрессии | Эффективность | Ссылки |
|---|---|----------------------|--|---|----------------------------|
| Вирус геморрагической лихорадки кроликов (RHDV) | Структурный белок VP60 | Клубни картофеля | 6–18 мг/г FW 3,5 мг/г TSP | Иммуногенное и частично защитное воздействие на кроликов при пероральном введении | Martin-Alonso et al., 2003 |
| Вирус чумы рогатого скота (RPV) домашние и дикие животные | Гемагглютинин (H) | Табак | До 0,75% TSP | Парентеральная иммунизация мышей | Khandelwal et al., 2003 |
| | Гемагглютинин (H) | Листья арахиса | 0,2–1,3% TSP | Пероральная иммунизация крупного рогатого скота | Khandelwal et al., 2004 |
| Ротавирус Животные, человек | Белки капсида VP2 и VP6 | Томат | 1% TSP | Парентеральная иммунизация мышей | Saldana et al., 2006 |
| | Белок капсида VP6 | Люцерна | 0.06–0.28% TSP | Пероральная иммунизация, защита потомства иммунизированных мышей | Dong et al., 2005 |
| | Белок капсида VP7 | Картофель | 0,18–3,84 мг/г TSP | Пероральная иммунизация мышей | Wu et al., 2003 |
| | Белок капсида VP7 | Клубни картофеля | 40 мг/г TSP | Пероральная иммунизация мышей | Li et al., 2006 |
| | Вариабельный домен тяжелой цепи антител лам (MusoRice-ARP1) | Рис | 11,9% от тотального белка семян (0,85% от массы семян) | Пероральная иммунизация мышей, полная защита от ротавирусной инфекции | Tokuhara et al., 2013 |

| Патоген/хозяин | Антиген | Растительная система | Уровень экспрессии | Эффективность | Ссылки |
|---|---|-----------------------------|--------------------------|--|-------------------------|
| Энтеротоксичные <i>Escherichia coli</i> (EPEC) Животные, человек | фимбрии K88 (фрагмент FaeG) | Табак | 0,15% TSP | Сыворотка парентерально иммунизированных мышей связывает EPEC | Huang et al., 2003 |
| | фимбрии K88 (фрагмент FaeG) | Ячмень, люцерна | 0,04–1,0% TSP | Сыворотка парентерально иммунизированных мышей ингибирует адгезию EPEC в кишечнике поросят | Joensuu et al., 2006 |
| | Фимбрии K99 (фрагмент FanC) | Листья сои | 0,4% TSP | Показан CD4+ Т-лимфоцитный ответ у парентерально иммунизированных мышей | Piller et al., 2005 |
| | СFA/I антиген фимбрий в комбинации с фрагментом A2 и субъединицей B холерного токсина и энтеротоксичным фрагментом ротавируса | Клубни картофеля | 0,0006–0,002% TSP | Пероральная иммунизация мышей против СFA/I | Lee et al., 2004 |
| | ESAT-6 слитый с субъединицей B (LTB) термолабильного токсина | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 11–24.5 мг/г FW (LTB) | Иммуногенны оба компонента слитого белка | Rigano et al., 2004 |
| | Субъединица B (LTB) термолабильного токсина | Табак | 2,2% TSP | Показано связывание с мембранным ганглиозидным рецептором GM1 <i>in vitro</i> | Kang et al., 2004, 2006 |
| | | Женьшень | 0,36% TSP | | |

| Патоген/хозяин | Антиген | Растительная система | Уровень экспрессии | Эффективность | Ссылки |
|--|--|---|--|---|------------------------------|
| <i>Fasciola hepatica</i> домашние животные | Цистеин-протеаза (домен) слитая с фрагментом убиквитина вируса гепатита В | Салат-латук | 100 мг/г DW (каталитический домен), 10–12 mg/g DW (лидерный домен) | Пероральная иммунизация мышей | Legocki et al., 2005 |
| Туберкулез <i>Mycobacterium tuberculosis</i> животные, человек | ESAT-6 слитый с субъединицей В (LTV) термолабильного токсина | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 11–24,5 мг/г сырого веса (LTV) | Иммуногенны оба компонента слитого белка | Rigano et al., 2004 |
| Бубонная и легочная чума <i>Yersinia pestis</i> Животные и человек | V и F1 антигены <i>Yersinia pestis</i> , слитые с субъединицей Б рицина | Культура корней табака (<i>Nicotiana tabacum</i>) | 44-45 нг RTB/г FW | Интраназальная иммунизация мышей к легочной чуме | Woffenden et al., 2008 |
| Вирус коровьей вирусной диареи (BVDV) | Структурный белок E2, слитый с адъювантной молекулой APCN | Люцерна | 1 мг/г сырого веса в листьях | Парентеральная иммунизация свиней, высокий титр антител к E2 в сыворотке | Aguirreburualde et al., 2013 |
| Холера <i>Vibrio cholerae</i> Животные и человек | Модифицированная субъединица Б холерного токсина MucRice-CTB | Рис | 2,35 мг СТВ /г семян | Пероральная иммунизация мышей и макак, высокий титр специфических IgA в сыворотке | Yoshikazu Yuki et al., 2013 |

Сокращения: FW- сырой вес, DW- сухой вес, TSP- тотальный растворимый белок, GUS-β-глюкуронидаза, GFP- зеленый флуоресцентный белок, СТВ-субъединица Б холерного токсина, LTV- субъединица Б термолабильного токсина *Escherichia coli*

1.5 Адьюванты

Вакцины, полученные из целых клеток, являются неоднородными и, как правило, содержат вещества, обладающие иммуностимулирующим действием, например, бактериальную ДНК и (или) энтеротоксины. Субъединичные вакцины состоят из отдельных пептидов или рекомбинантных белков, которые в основном обладают слабой иммуногенностью. Таким образом, чистые рекомбинантные белковые антигены нуждаются в присутствии дополнительных компонентов, повышающих иммунный ответ. Такие вещества, которые стимулируют антиген-специфический иммунный ответ называют адьювантами. К настоящему времени известно несколько типов адьювантов, и этот список продолжает пополняться. В таблице 5 представлены некоторые примеры адьювантов, свойства которых были оценены в исследованиях на животных.

Адьюванты могут быть использованы для различных целей: увеличения продолжительности иммунного ответа, модулирования специфичности антител, стимулирования клеточного иммунного ответа, а так же для уменьшения необходимой дозы антигена, тем самым позволяя уменьшить затраты на производство рекомбинантных вакцин (Singh and O'Hagan, 1999). Механизмы действия адьювантов до конца не изучены. Предполагается, что активация иммунного ответа адьювантом является результатом каскада событий, таких как индуцирование синтеза цитокинов и активации антиген-презентирующих клеток (APCs) за счет увеличения экспрессии молекул костимуляции и главного комплекса гистосовместимости (МНС) (Singh and O'Hagan, 1999).

Выбор адьюванта будет полностью зависеть от способа введения антигенов. Как правило, при парентеральном введении вакцин используют минеральные соли, эмульсии и микрочастицы.

Таблица 5 - Типы адъювантов, используемых при вакцинации (по Andersson, 2000, с изменениями)

| Типы адъювантов | Примеры | Ссылки |
|---------------------------------------|--|-----------------------------|
| Минеральные соли | Гидроксид алюминия | Gupta, 1998 |
| | Фосфат кальция | Wang et al., 2000 |
| Липидные частицы и эмульсии | Полный адъювант Freund (a) | Chang et al., 1998 |
| | Липосомы | Gregoriadis et al., 1999 |
| | Ко-хелаты | Gould-Fogerite et al., 1998 |
| Микрочастицы | PLG микрочастицы | O'Hagan et al., 1998 |
| | Вирусоподобные частицы | Coste et al., 2000 |
| Адъюванты для пероральной иммунизации | Термолабильный токсин <i>Escherichia coli</i> (LT) | Verweij et al., 1998 |
| | Субъединица Б холерного токсина (CTB) | Tamura et al., 1994 |
| | Субъединица Б рицина (RTB) | Medina-Bolivar et al., 2003 |

При производстве «съедобных» вакцин к адъювантам предъявляют ряд дополнительных условий. Одним из критериев при выборе адъюванта для вакцины растительной природы является возможность его синтеза совместно с рекомбинантным антигеном. Таким критериям соответствует ряд белков микробного, вирусного и растительного происхождения, обладающих иммуностимулирующими свойствами. Наиболее часто используемыми адъювантами являются субъединица Б холерного токсина (Tamura et al., 1994) и субъединица Б термолабильного токсина *E. coli* (Verweij et al., 1998). Кроме того, рядом авторов показана возможность использования в качестве адъювантов таких белков как LMP1 (латентный мембранный белок 1 оболочки вируса Эпштейна-Барра) (Gupta et al., 2011), поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) (Karusta et al., 1999, 2001; Kong et al., 2001), субъединица Б рицина клещевины *Ricinus communis* (Medina-Bolivar et al., 2003).

Холерный токсин – олигомерный белковый комплекс *Vibrio cholerae*, состоящий из одного домена А и пяти доменов В. Субъединица Б холерного токсина (СТВ, массой около 12 кДа), выполняющая функции связывания с рецепторами эндотелиальных клеток обладает свойством стимулировать врожденный иммунитет (Tamura et al., 1994). Было показано, что использование интраназальных вакцин в сочетании с СТВ у мышей приводит к активации Т- лимфоцитов и увеличению синтеза IL-1 β - основного цитокина, индуцирующего врожденный и адаптивный иммунитет (Matuso et al., 2000). Полученные данные позволили использовать СТВ в качестве молекулярного адъюванта при разработке мукозальных вакцин против чумы (Tinker et al., 2010), парвовируса собак (Molina et al., 2004, 2005) и многих других (Holmgren et al., 2005).

Термолабильный токсин *Escherichia coli* (LT) – чувствительный к нагреванию токсин, вырабатываемый некоторыми штаммами кишечной палочки. По строению и токсикологическим свойствам LT подобен холерному токсину. Субъединица Б термолабильного токсина (ЛТВ) также способна к активации лимфоцитов и синтеза иммуноглобулинов (Verweij et al., 1998). Помимо этого, было показано сохранение

адьювантных свойств ЛТВ при экспрессии в растительных системах (Wagner et al., 2004). Это позволило использовать субъединицу Б термолabileного токсина при разработке съедобных вакцин растительного происхождения против чумы (Santi et al., 2006), туберкулеза (Rigano et al., 2004), а так же классических вакцин против кишечных инфекций (Glenn et al., 2009) и гриппа (Tamura et al., 2000).

Латентный мембранный белок оболочки 1 (LMP1) представляет собой интегральный белок оболочки вируса Эпштейна-Барра с молекулярным весом около 63кДа, состоящий из трех доменов. Экспрессия LMP1 вызывает значительную активацию первичных В-лимфоцитов, повышает экспрессию на поверхности клеток белков CD23, CD39, CD40, CD44, и молекул клеточной адгезии CD11a (LFA1), CD54 (ICAM1), CD58 (LFA3) (Gregory et al., 1991; Henderson et al., 1991). В работе Гупта с соавторами (Gupta et al., 2011) показано что, включение LMP1 в состав псевдовирусных частиц SIV значительно усиливает активацию дендритных клеток и макрофагов последними, а так же повышает адгезию Gag-специфических Т - клеток *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования LMP1 в качестве молекулярного адьюванта при создании рекомбинантных вакцин (Gupta et al., 2011).

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) способен к самоорганизации в высокоиммуногенные изометрические структуры (Valenzuela et al., 1982). В трансгенных растениях рекомбинантный HBsAg образует трубчатые структуры, накапливающиеся внутриклеточно (Smith et al., 2003). Пероральная иммунизация мышей растительным материалом, содержащим рекомбинантный антиген, приводила к значительному усилению синтеза специфических антител и повышала устойчивость животных к вирусу гепатита В (Kapusta et al., 1999, 2001). В последующем рядом автором были выполнены работы по использованию HBsAg в качестве молекулярного адьюванта при разработке рекомбинантных вакцин с использованием GAG- эпитопа вируса иммунодефицита человека (Shchelkunov et al., 2006), поверхностного гликопротеина Е вируса Денге (Martí'nez et al., 2010) и др.

Рицин – лектин клещевины *Ricinus communis* представляет собой гликопротеин с глобулярной структурой. Белковая часть молекулы состоит из 560 аминокислотных остатков (их последовательность установлена) и построена из двух субъединиц- доменов А и Б, соединенных одним дисульфидным мостиком. Субъединица Б рицина (RTB) нетоксична и выполняет транспортные и рецептофильные функции: связывается со специфическими рецепторами клеточных мембран, вызывая структурную перестройку мембраны с образованием трансмембранного канала (Sphyris et al., 1995). В работе Медино-Боливар с соавторами (Medina-Bolivar et al., 2003) было показано существенное увеличение специфических к зеленому флуоресцентному белку (GFP) иммуноглобулинов в крови мышей при скармливании им растений, синтезирующих рекомбинантный слитый белок RTB-GFP в сравнении с кровью иммунизированных только против GFP мышей. Полученные результаты были сходны с данными по иммунизации мышей GFP, слитым с субъединицей Б холерного токсина – традиционно используемого в вакцинах растительного происхождения адъюванта (Medina-Bolivar et al., 2003). В последующем адъювантные свойства субъединицы Б рицина были также показаны при слиянии с ротавирусным белком NSP4 (Choi et al., 2006 a,b), белками V и F1 возбудителя чумы *Yersinia pestis* (Woffenden et al., 2008), белком оболочки вируса иммунодефицита человека p24 (Donayre-Torreset al., 2009) и др. Как показано Лиу с соавторами, рекомбинантная субъединица Б рицина стимулирует иммунную систему животных, участвуя в активации Т-лимфоцитов и макрофагов и оказывает положительный эффект на иммуномодулирующую активность антигенов (Liu et al., 2013).

1.6 Вирус гриппа

В последние годы эпидемическая значимость гриппозных инфекций значительно возросла. Распространение вирусных инфекций стало глобальным и требует от государств значительного экономического ресурса для борьбы с ними.

Ежегодно гриппозные инфекции уносят жизни около 250000 человек во всем мире (Graham-Rowe, 2011). В таблице 6 представлены данные о наиболее значимых гриппозных эпидемиях, произошедших в период XX-XXI века. Степень защищенности человека в значительной мере зависит от возможности прогнозирования появления в популяции людей новых штаммов вирусов гриппа. Вирус гриппа принадлежит к группе легко мутирующих вирусов, способных избегать защитных механизмов иммунной системы хозяина. Благодаря этому свойству в последние десятилетия появилось много штаммов вируса гриппа, имеющего различных хозяев – человека, собак, свиней, лошадей, птиц, причем вирус успешно циркулирует как в природных сообществах, так и среди домашних животных (Nicholson et al., 2003). Вирусы гриппа, инфицирующие птиц, называют «вирусами гриппа птиц». Грипп птиц известен давно и до последнего времени не представлял особой проблемы. Однако в последнее время ситуация существенно изменилась. В первую очередь это связано с появлением особо патогенных для домашних птиц штаммов вируса и концентрацией производства на больших птицефабриках. При неблагоприятных условиях заражение птиц этими штаммами может привести к 100% гибели поголовья. Масштабная эпидемия птичьего гриппа приведет к огромным прямым и косвенным убыткам, что может надолго остановить развитие птицеводческой отрасли. Борьба с гриппом птиц крайне затруднена тем обстоятельством, что природным резервуаром птичьего гриппа являются дикие водоплавающие и околоводные птицы, которые в процессе миграции могут преодолевать большие расстояния. При контакте диких птиц с домашними, в первую очередь гусями и утками, происходит интродукция инфекции в домашние хозяйства. Контроль же за природными популяциями диких водоплавающих птиц, обычно перелётных, или их уничтожение, представляется нереальным с практической точки зрения. В этом случае вакцинация представляется наиболее эффективным средством борьбы с вирусом (Neumann et al., 2010; Graham-Rowe, 2011).

Таблица 6 - Мировые пандемии в XX-XXI вв., вызванные вирусом гриппа (по данным Graham-Rowe, 2011)

| Годы | Наиболее распространенный подтип вируса | Пораженные регионы | Некоторые особенности эпидемий | Количество летальных исходов |
|-------------|--|----------------------------------|--|-------------------------------------|
| 1890 | * | Россия | Первая зарегистрированная пандемия вируса гриппа | Около одного миллиона |
| 1918 | H1N1 | Европа, Россия, Северная Америка | «Испанка» | Около 50 миллионов |
| 1957, 1959 | H2N2, H7N7 | Азия | - | Около 100 тысяч |
| 1968 | H3N2 | Гонконг | - | 700 тысяч |
| 1977 | H1N1 | Россия | - | * |
| 1995 | H7N7 | Голландия | Начало эпидемии «куриной чумы» | |
| 1997 | H5N1 | Азия | Первый случай передачи вируса от птиц к человеку | Несколько сотен |
| 2003-2004 | H7N3, H10N7, H7N7 | Европа, Азия | - | * |
| 2009-2011 | H1N1 | 48 стран | Первая пандемия гриппа за последние 40 лет | Несколько сотен |

* – требует дополнительных исследований.

1.7 Организация генома вирусов гриппа типа А

Вирус гриппа принадлежит к семейству *Orthomyxoviridae*, члены которого содержат сегментированный РНК-геном отрицательной полярности и относятся к так называемым (-) - геномным вирусам. Цикл репликации вируса гриппа, представленный на рисунке 2, состоит из следующих стадий (по Whittaker, 2001): связывание вириона с сиаловыми кислотами рецепторов клетки; поглощение вириона клеткой в составе ранней эндосомы; высвобождение генетического аппарата вируса в цитоплазму клетки и его проникновение в ядро; репликация мРНК и синтез белков; сборка новых вирусных частиц на плазматической мембране клетки.

В пределах семейства ортомиксовирусов основными представителями являются вирусы гриппа трех типов: А, В и С. Геном вируса гриппа типа А состоит из 8 сегментов РНК, каждый из которых кодирует 1-2 белка. Каждый тип вируса гриппа в свою очередь делится на ряд подтипов, классификация которых основана на антигенных различиях двух поверхностных гликопротеинов: гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (N). В настоящее время различают 16 подтипов гемагглютинина и 9 подтипов нейраминидазы (Knipe et al., 2007). На рисунке 3 представлены подтипы вирусов гриппа типа А и их естественные хозяева.

Принято считать, что первичным резервуаром вирусов гриппа являются перелетные птицы, принадлежащие к отрядам *Anseriformes* (дикие утки и гуси) и *Charadriiformes* (цапли, ржанки и крачки). С 1961 г. по настоящее время в Северной Америке, Европе, Индии, Японии, Южной Африке и Австралии вирус гриппа птиц был выделен, по крайней мере, у 90 представителей 12 отрядов птиц (Stallknecht, 1997). Вирус гриппа птиц обычно не передается человеку напрямую от птиц и не циркулирует среди людей. Для понимания роли птиц в эволюции вирусов гриппа следует подчеркнуть, что все подтипы вирусов гриппа (НА1-НА16 и N1-N9) выделены от водоплавающих птиц.

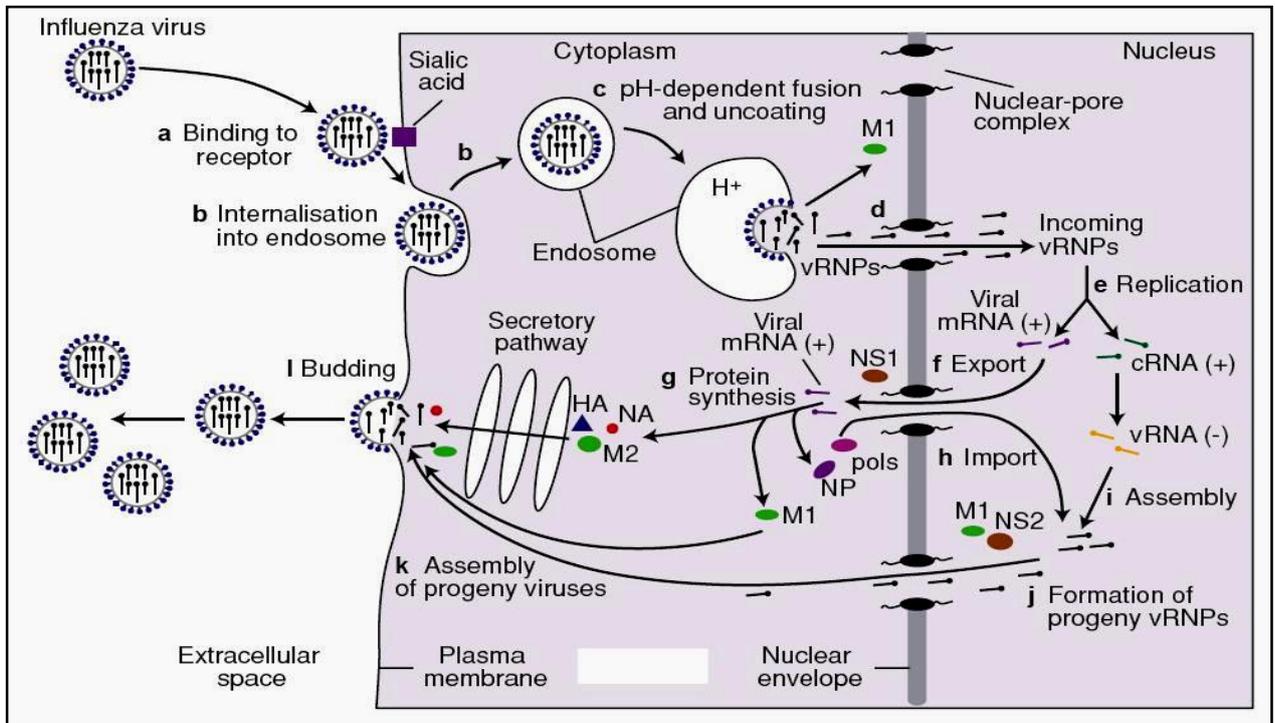


Рисунок 2 - Цикл репликации вируса гриппа (Whittaker, 2001)

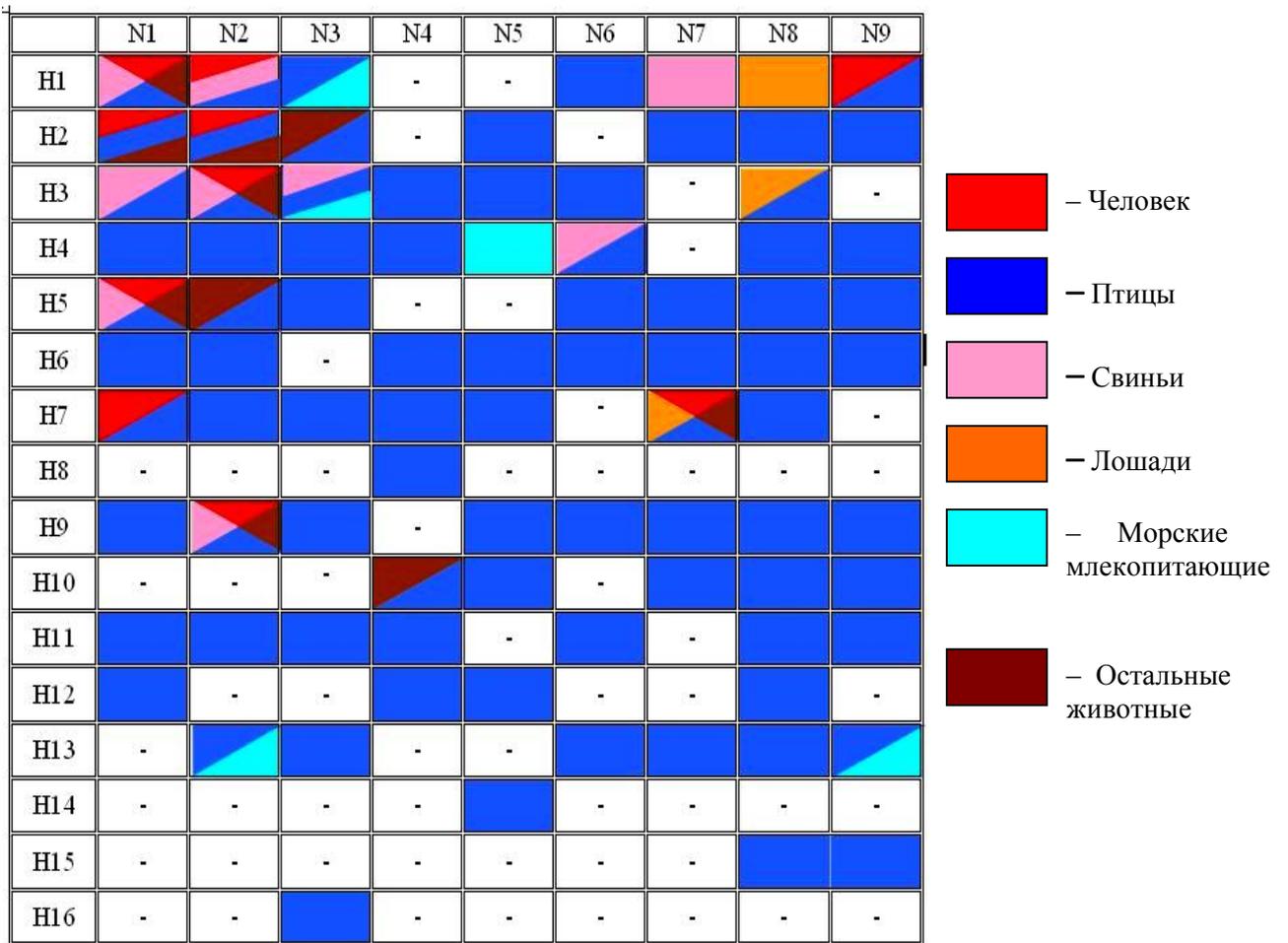


Рисунок 3 - Подтипы вируса гриппа типа А, циркулирующие в различных популяциях

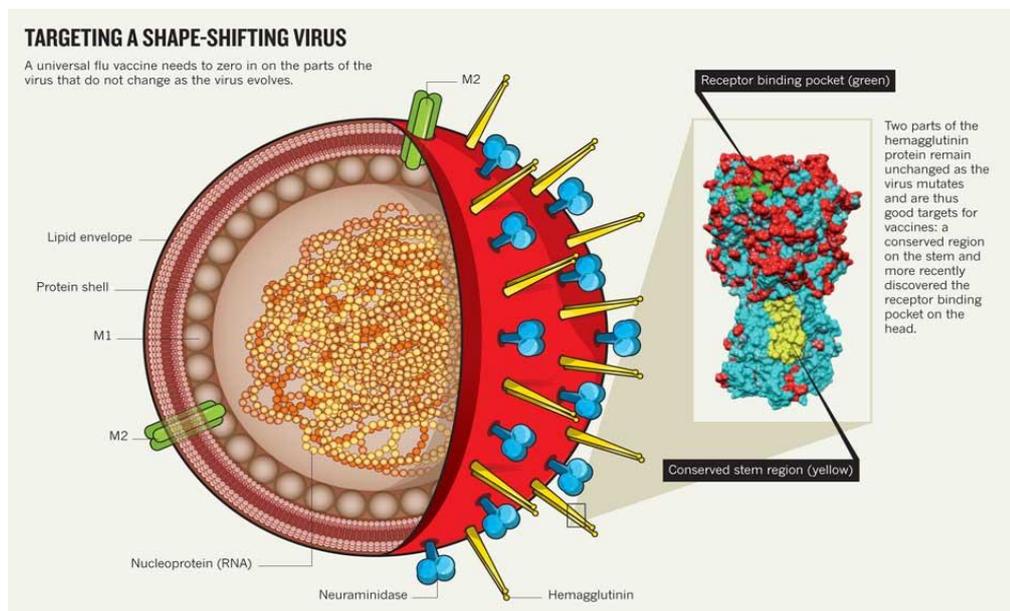


Рисунок 4 - Схематическое изображение вируса гриппа типа А
 (по J. Schuller, 2011)

Таблица 7 - Сегменты генома вируса гриппа типа А и функциональная роль продуктов экспрессии в репликативном цикле вируса (по Knipe et al., 2007)

| Сегмент | Размеры генов в н.п. | Название полипептида | Функции |
|---------|----------------------|----------------------|--|
| I | 2341 | PB2 | Компонент транскриптазного комплекса: связывание 5'-концевых кэпов мРНК |
| II | 2341 | PB1; PB1-F2 | Компонент транскриптазного комплекса: элонгация синтеза РНК; Виропорин – вызывает образование пор в митохондриях и индуцирует апоптоз |
| III | 2233 | PA | Компонент транскриптазного комплекса: эндонуклеаза |
| IV | 1778 | HA | Гемагглютинин: распознавание и связывание с рецептором. Фьюзогенные пептиды HA2 формируют атакующий комплекс. |
| V | 1565 | NP | Нуклеопротеин: основной компонент вирусного РНП, компонент транскриптазного комплекса, осуществляет контроль ядерно-цитоплазматического транспорта РНК |
| VI | 1413 | NA | Нейраминидаза: отщепление остатков сиаловых кислот, освобождение вирусов от рецептора плазматических мембран, почкование. |
| VII | 1027 | M1; M2 | Обеспечивает процессы самосборки вирусных частиц и их почкование; Образует ионный канал. |
| VIII | 890 | NS1; NS2(NEP) | Неструктурные белки: контролирует сплайсинг и полиаденилирование; контролирует ядерно-цитоплазматический транспорт мРНК |

Однако в популяции человека выявлены вирусы только трех подтипов с гемагглютинидами Н1, Н2 и Н3. При этом эти вирусы содержат только два типа нейраминидазы – N1 и N2. Была показана стабильная циркуляция этих вирусов в течение всего прошлого столетия, начиная с пандемии 1918 (Graham-Rowe, 2011). Три подтипа вируса гриппа А из представленных (Н1N1, Н2N2, Н3N2) явились возбудителями гриппозных пандемий среди людей в XX столетии, другие – вызывают заболевания среди млекопитающих и птиц. Среди наиболее патогенных для домашних птиц выделяются вирусы с антигенной формулой Н7N7 (вирус «куриной чумы») и Н5N1. Высоко патогенные варианты вируса гриппа Н7N7 вызвали в 2003 г. повсеместное поражение фермерских куриных хозяйств в Нидерландах, тогда как вирус Н5N1, начиная с 1997 г., стал причиной гибели нескольких тысяч человек и миллионов кур по всему миру, в первую очередь в странах Юго-Восточной Азии и Китая (Neumann et al., 2010).

В состав оболочки частицы вируса гриппа входит несколько видов белков, участвующих во взаимодействии вирус-клетка (рисунок 4) - гемагглютинин, нейраминидаза, белки матрикса М1 и М2. С точки зрения патогенности представляют интерес следующие белки вирусов гриппа типа А: гемагглютинин, нейраминидаза, белок М2, белок NS1, белок PB1-F2. Вклад этих белков в патогенность вируса достаточно глубоко изучен при исследованиях особо патогенных изолятов (таблица 7).

Основной патоген - специфической молекулой вирусов гриппа считается гемагглютинин (НА). Как рецептор - связывающий белок он обладает двумя ключевыми свойствами: способностью специфически распознавать клеточный рецептор и таким образом определять способность вируса к преодолению межвидовых барьеров, а так же отвечает за образование атакующего или «фьюжн» комплекса, детерминирующего способность вируса к проникновению в клетки и развитию в них репродуктивного процесса (Webster, 1998). В результате исследований установлено, что различные НА отличаются по способности к распознаванию и связыванию с рецептором – сиаловой кислотой, которая связана в

олигосахаридах клеточных мембран с галактозой. HA вирус гриппа человека связывается с остатками сиаловой кислоты, связанной 2,6 – связью с галактозой, а HA птичьих вирусов распознает сиаловую кислоту в 2,3 – связи с остатками галактозы (McCullough et al., 2012).

Еще одним фактором патогенности вируса гриппа подтипа А является нейраминидаза – фермент, контролирующий процессы почкования и высвобождения зрелых вирусных частиц от мембран инфицированных клеток путем отщепления остатков сиаловых кислот от гемагглютинина. Кроме этого нейраминидаза играет определенную роль в начальных стадиях проникновения вирусов гриппа в клетки, то есть в их инфицировании, а так же в высвобождении новых вирусных частиц из инфицированных клеток, возможно, благодаря разрыву гликозидных связей с сиаловыми кислотами в молекулах гемагглютинина образующихся вирусных частиц (Cross et al., 2001; Wagner et al., 2002).

При создании противогриппозных вакцины на основе гемагглютинина и нейраминидазы необходимо учитывать постоянное изменение аминокислотной последовательности этих белков в циркулирующих штаммах вируса гриппа. Данное изменение антигенной структуры белка, называемое антигенным дрейфом, является результатом естественного отбора штаммов вируса в ходе изменения аминокислотных остатков в пяти основных антигенных участках гемагглютинина (Plotkin and Dushoff, 2003). Давление отбора проявляется в воздействии антител, способных нейтрализовать «родительские» штаммы. Антигенный дрейф наблюдается для вирусов гриппа домашней птицы, но в больших масштабах – в популяции людей. Так, все три штамма вируса циркулирующие в зимний сезон 2008-2009 гг. и отобранные для создания сезонной вакцины отличались от трех штаммов вируса, циркулирующих в 2007-2008 гг. Антигенный дрейф гемагглютинина и нейраминидазы был имитирован *in vitro* в присутствии моноклональных антител, с частотой селекции мутантных по гемагглютинину и нейраминидазе вариантов 10^{-5} - 10^{-6} . Мутации в аминокислотной последовательности гемагглютинина и нейраминидазы человеческих вирусов гриппа в естественных

условиях появляются с частотой менее чем 1 % в год. Однако этого достаточно для появления раз в 2-5 лет особо патогенных штаммов вируса гриппа с новой антигенной структурой (Knipe et al., 2007).

Помимо нейраминидазы и гемагглютинаина перспективным антигеном для создания противогриппозных вакцин считается белок протонного канала M2.

1.8 Характеристика белка M2

Впервые белок M2 был описан в 1981 году как продукт, кодируемый 7-м сегментом РНК вируса гриппа (Lamb and Choppin, 1981). В последующем было показано, что M2 является интегральным мембранным белком III типа, тетрамером, не имеющим сигнальной последовательности. M2 формирует ионный канал, и его основная роль состоит в проведении протонов из кислой среды эндосомы внутрь вириона, что приводит к диссоциации рибонуклеотидного комплекса вириона и к его высвобождению из капсида в цитоплазму клетки-хозяина (Knipe et al., 2007). Вирус попадает в клетку хозяина путем рецепторзависимого эндоцитоза и миграции внутрь клетки в составе ранней эндосомы. Мембрана эндосомы содержит АТФ-зависимые протонные каналы, которые накачивают ионы H^+ из цитозоля в эндосому. Для раскрытия вирусной частицы протоны из поздней эндосомы должны поступить в вирион через протонный канал M2, который находится в стенке капсида (рисунок 4) и запускается в ответ на закисление внутренней среды поздней эндосомы. Поступление протонов внутрь вириона вызывает высвобождение генетического материала вируса в цитоплазму клетки-хозяина. Структурный анализ белка M2 показал, что формируемый им ионный канал является рН-зависимым и высокоселективным для H^+ -ионов. Блокирование M2 препятствует инфицированию клетки-хозяина вирусом. (Knipe et al., 2007).

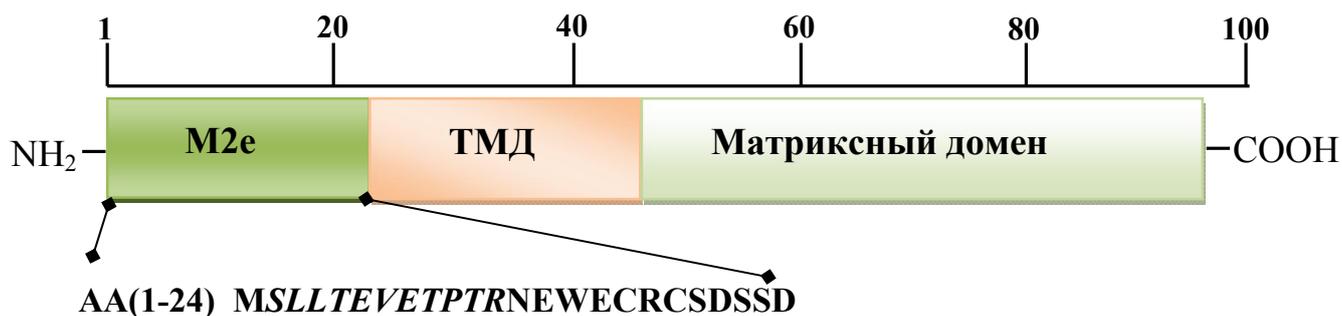


Рисунок 5 - Схема строения белка M2 вируса гриппа

Курсивом выделен антигенный эпитоп пептида M2e, ТМД – трансмембранный домен.

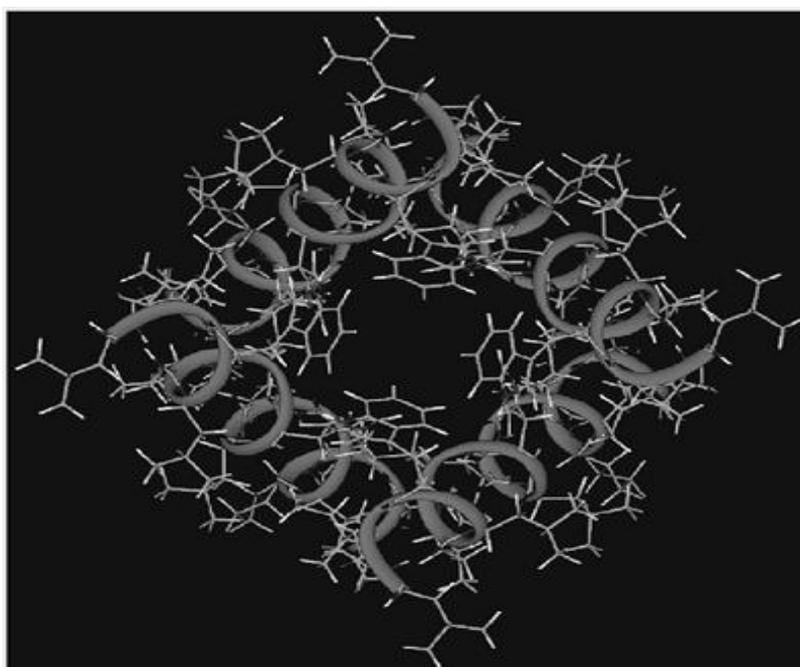


Рисунок 6 - Структура тетрамера белка M2 (по Knipe et al., 2007)

На рисунке показаны четыре α -спирали, расположенные под углом к липидному бислою и формирующие пору. Третичная структура была определена с помощью ЯМР-спектроскопии.

Белок М2 состоит из 97 аминокислотных остатков и включает в себя (рисунок 5): N-терминальный экстрамембранный фрагмент длиной 24 а.о., называемый пептид М2е; трансмембранный участок длиной 19 а.о. (с 25 по 43 а.о.); С-терминальный фрагмент, длиной 54 аминокислотных остатка (с 44 по 97 а.о.), локализованный на внутренней стороне мембраны (Schnel et al., 2008). С-терминальный фрагмент участвует в формировании вирусной частицы, предположительно, за счет взаимодействия с матричным белком М1 (Ma et al., 2009). Трансмембранный участок представлен четырьмя α -спиралями, расположенными под углом в липидном бислое, и формирующими пору протонного канала (рисунок 6). Было показано, что накопление амантадина и римантадина - распространенных противогриппозных препаратов, происходит в областях пересечения α -спиралей, тем самым блокируя функции ионного канала (Pielak et al., 2009; Cady et al., 2010).

Внешний домен – пептид М2е – важен при включении белка М2 в состав вирусной оболочки (Park et al., 1998). Сравнение аминокислотной последовательности пептида М2е у различных штаммов вируса, показывает незначительную изменчивость антигенного эпитопа, расположенного на N-конце белка (Fiers et al., 2001, таблица 8). Аминокислотная последовательность данного пептида остается почти неизменной со времен пандемии «Испанского» гриппа 1918 г., что делает его привлекательным объектом для создания «универсальной» противогриппозной вакцины (Ma et al., 2009; Schotsaert et al., 2009).

Таблица 8 - Аминокислотная последовательность пептида M2e в различных изолятах вируса гриппа А (по данным Fiers et al., 2001)

| | |
|--|----------------------------------|
| A/WS/1933 (H1N1) | <i>MSLLTEVETPIR</i> NEWGCRCNDSSD |
| A/PR/8/1934 (H1N1) | <i>MSLLTEVETPIR</i> NEWGCRCNDSSD |
| A/USSR/90/1977 (H1N1) | <i>MSLLTEVETPIR</i> NEWGCRCNDSSD |
| A/Singapore/1/1957 (H2N2) | <i>MSLLTEVETPIR</i> NEWGCRCNDSSD |
| A/Leningrad/134/1957 (H2N2) | <i>MSLLTEVETPIR</i> NEWGCRCNDSSD |
| A/Bangkok/1/1979 (H3N2) | <i>MSLLTEVETPIR</i> NEWGCRCNDSSD |
| A/Guangdong/39/1989 (H3N2) | <i>MSLLTEVETPIR</i> NEWGCRCNDSSD |
| A/blow fly/Kyoto/93/2004(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |
| A/chicken/Hubei/327/2004(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |
| A/chicken/Kurgan/3/2005(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |
| A/domestic green-winged teal/Hunan/67/2005(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |
| A/duck/Omsk/1822/2006(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |
| A/pigeon/Rostov-on-Don/6/2007(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |
| A/chicken/Nigeria/1071-30/2007(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |
| A/chicken/Laos/37/2008(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |
| A/chicken/India/WB-NIV92456/2009(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |
| A/bean goose/Tyva/10/2009(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |
| A/common goldeneye/Mongolia/X60/2009(H5N1) | <i>MSLLTEVETPTR</i> NEWECRCSDSSD |

жирным курсивом выделен антигенный эпитоп.

Было показано, что при инъекции анти-M2e моноклональных антител иммунодефицитным мышам, зараженным вирусом гриппа, можно изолировать штаммы вируса, мутантные по пептиду M2e (Zharikova et al., 2005). Данные мутанты имели замены в первых 10 аминокислотах, консервативных для изолятов вируса. Но даже после 11-ти последовательных пассажей мутантными по M2e пептиду штаммами не удалось заразить иммунокомпетентных мышей, что, предположительно, говорит о низкой возможности антигенного дрейфа в составе аминокислотной последовательности белка M2 (Gerhard et al., 2006). В связи с этим предполагается, что широкое использование вакцин на основе белка M2 не приведет к антигенному дрейфу аминокислотной последовательности. Возможно, именно малый размер и труднодоступность для антител определяют отсутствие антигенного дрейфа в аминокислотной последовательности пептида M2e. Консервативность пептида M2e может также определяться его генетической связью со вторым белком – оба матричных белка – M1 и M2 – продуцируются в ходе сплайсинга с одного сегмента генома вируса гриппа. Первые 15 аминокислот пептида M2e кодируются той же частью сегмента РНК, которая кодирует в другой рамке считывания С-конец белка M1. Т.е. мутации во внешнем экстремембранном домене пептида M2e приведут к инактивации матричного белка M1, участвующего в самосборке вирусных частиц. Возможно, именно это обстоятельство и определяет консервативность пептида M2e. Если это так, то пептид M2e – идеальный объект для создания универсальной противогриппозной вакцины широкого спектра действия (Gerhard et al., 2006).

1.9 Использование пептида M2e для создания универсальной противогриппозной вакцины

Первое упоминание о том, что белок M2 обладает способностью активизировать иммунную систему животных и обеспечивать противовирусную защиту, появилось в 1988 г. Это было продемонстрировано на мышах, которым вводились клетки, инфицированные вирусом гриппа типа А. Моноклональные

антитела против белка M2, полученные из сыворотки этих мышей, практически полностью уничтожали бляшки клеток *in vitro*, инфицированных вирусом гриппа. Введение данных моноклональных антител также уменьшало титр вируса в легких зараженных мышей (Zebedee et al., 1988). В дальнейшем рядом авторов было показано, что иммунный ответ, индуцированный рекомбинантным белком M2, может защищать подопытных животных от прямого введения вируса гриппа. Ву с коллегами показали развитие устойчивости к летальным дозам вируса гриппа у мышей, иммунизированных синтетическим пептидом M2e в присутствии адьюванта (Wu et al., 2007). Ванг с соавторами изолировали В-клетки человека, несущие моноклональные антитела против M2 и получили культуры клеток млекопитающих, синтезирующих анти-M2 антитела. При введении их вместе с летальной дозой вируса гриппа типа А мышам, подопытные животные выживали, из чего авторы делают вывод о возможном использовании моноклональных антител против M2 для индукции пассивного иммунитета у пациентов (Wang et al., 2008). Подобное исследование провели Бирли с соавторами на примере пептида M2e - экстрамембранного домена белка M2. После введения мышам моноклональных антител к пептиду M2e одновременно с летальной дозой вируса гриппа А, подопытные животные так же выживали (Beerli et al., 2009).

К настоящему времени большинство попыток использования белка M2 при разработке противогриппозных вакцин сводится к использованию пептида M2e, ввиду высокой консервативности его аминокислотной последовательности, а также возможной доступности для антител (Ebrahimi and Tebianian, 2011).

Таблица 9 - Некоторые примеры потенциальных противогриппозных вакцин, разработанных на основе пептида M2e.

| Конструкция | Экспрессионная система | Адьювант | Эффективность | Ссылки |
|---|--|---|--|----------------------------|
| M2e – MAP (четыре повтора пептида M2e вируса H5N1 штамма VN/1194) | Получен химическим путем | Полный адьювант Фрейда или «Алюм» - адьювант (соли алюминия) | Индукцирует синтез специфических IgG у мышей, защищает от летальных доз вируса H5N1 нескольких штаммов | Zhao et al., 2010 |
| M2e-HBc (три повтора M2e H1N1 слиты с N-терминальным доменом ядерного белка гепатита В) | <i>E. coli</i> штамм TB1 | СТА1-DD субъединица А холерного токсина слитая с D-доменом белка А (<i>Staphylococcus aureus</i>) | защищает от летальных доз вируса интраназально иммунизированных мышей | De Filette et al, 2005a, b |
| M2e-tGCN4 (M2e H1N1 слитый с лейциновым доменом транскрипционного фактора дрожжей GCN4) | <i>Escherichia coli</i> штамм BL21 | СТА1-DD | Интраназальная иммунизация мышей индуцирует синтез специфических IgG | De Filette et al., 2008 |
| M2e-CD154 (M2e слитый с доменом внешнего мембранного белка LamB сальмонелл) | Рекомбинантный штамм <i>Salmonella</i> | Не использовался | Пероральная иммунизация цыплят вызывает индукцию специфических IgG, защищает от летальных доз вируса | Layton et al., 2009 |
| 3M2eC (три повтора пептида M2e вируса подтипа H1N1) | <i>E. coli</i> штамм BL21 (DE3) | Холерный токсин | Интраназальная иммунизация индуцирует синтез специфических IgG у мышей, защищает от летальных доз вируса нескольких подтипов | B.-S. Shim et al., 2011 |

| Конструкция | Экспрессионная система | Адьювант | Эффективность | Ссылки |
|--|--|---|---|-----------------------|
| 3 повтора пептида M2e подтипа H1N1 штамма A/Texas/05/2009 | <i>E. coli</i> | Сочетание CpGODN 1826 («Sigma») и холерного токсина | Интраназальная иммунизация мышей вызывает образование в крови специфических IgG и защищает от летальных доз вируса нескольких подтипов | Wolf et al., 2011 |
| M2e-HBc (пептид M2e подтипа H5N2 штамма A/Duck/Potsdam/1402-6/1986, слитый с ядерным белком гепатита В) | Транзиентная экспрессия в растениях <i>N. benthamiana</i> , с уровнем в 1-2 % от общего растворимого белка | Неполный адьювант Фрейда | Внутрибрюшинная иммунизация мышей очищенным препаратом индуцирует синтез специфических IgG и защищает от летальных доз вируса подтипа H5N1 | Равин и др., 2012 |
| M2e-HSP70 ₃₅₉₋₆₁₀ (M2e H1N1 слитый с C - доменом белка теплового шока <i>Mycobacterium tuberculosis</i>) | <i>E. coli</i> | Не использовался | Индукцирует синтез IgG, специфических к M2e и полностью (100%) защищает иммунизированных мышей от летальных доз вируса гриппа подтипа H1N1 нескольких штаммов | Ebrahimi et al., 2011 |

Одной из сложностей в создании вакцины является то, что пептид M2e ввиду своего малого размера (24 а.о.) труднодоступен для взаимодействия с иммунокомпетентными клетками. Было показано, что в сыворотке крови переболевших людей антитела против пептида M2e практически не детектируются (Liu et al., 2003). То же самое показали Фенг с соавторами, разработав более чувствительную систему детекции анти-M2e антител на основе клеточной линии HeLa и исследовав иммунный ответ сыворотки крови переболевших гриппом пациентов – пул моноклональных антител против пептида M2e природного возбудителя низкий, либо полностью отсутствует (Feng et al., 2006). Тем не менее, данные факты не явились препятствием для использования M2e при разработках противогриппозных вакцины широкого спектра действия. В таблице 9 собраны данные о некоторых потенциальных противогриппозных вакцинах, разрабатываемых на основе пептида M2e.

Де Филетте с коллегами получили генетическую конструкцию, в которой три тандемных повтора пептида M2e были слиты с N- терминальным доменом корового белка вируса гепатита В. После экспрессии в бактериальной системе и очистки рекомбинантный белок был использован для интраназальной иммунизации мышей. В качестве адъюванта авторы использовали рекомбинантный белок СТА1-DD, в котором субъединица А холерного токсина слита с D-доменом белка А - сильного антигена из *Staphylococcus aureus*. В результате была показана устойчивость иммунизированных животных к летальным дозам вируса гриппа нескольких подтипов (De Filette et al, 2005a, b). В последующем этой же группой исследователей была проведена работа по экспрессии в бактериальной системе пептид M2e в трансляционном слиянии с доменом «лейциновой молнии» фактора транскрипции дрожжей GCN4. После интраназальной иммунизации мышей полученным рекомбинантным белком в присутствии СТА1-DD адъюванта методом ELISA была показана способность иммуноглобулинов IgG, выделенные из сыворотки таких мышей, связываться с клетками, несущими пептид M2e на поверхности мембраны (De Filette et al., 2008).

Зао с соавторами химическим путем синтезировали пептид, состоящий из четырех повторов M2e, идентичных пептиду вируса гриппа подтипа H5N1 штамма VN/1194. Полученный рекомбинантный белок, обозначенный как M2e – MAP был использован для внутрибрюшинной иммунизации мышей. Было показано, что M2e – MAP индуцирует синтез специфических IgG в крови иммунизированных мышей и защищает зараженных животных от летальных доз вируса гриппа H5N1 нескольких штаммов (Zhao et al., 2010).

Лайтон с коллегами экспрессировали в штамме *Salmonella* пептид M2e слитый с CD154 доменом внешнего мембранного белка LamB сальмонелл. Полученным бактериальным штаммом, содержащим M2e-CD154, была проведена пероральная иммунизация цыплят. В результате было показано присутствие в крови иммунизированных птиц специфических к M2e иммуноглобулинов класса G, а также устойчивость этих животных к летальным дозам вируса гриппа подтипа H7N2 (Layton et al., 2009).

В настоящее время также предпринимаются попытки создания универсальной противогриппозной вакцины на основе растительных транзientных экспрессионных систем. Так, Н.В. Равин с коллегами опубликовали в 2012 году работу, посвященную продукции в растениях рекомбинантной вакцины на основе пептида M2e. Авторами был получен рекомбинантный вирусный вектор на основе генома вируса X картофеля, содержащий последовательность пептида M2e вируса гриппа подтипа H5N2 в слиянии с последовательностью корового антигена вируса гепатита В (HBs). Введение вектора в растительные клетки табака (*N. benthamiana*) осуществлялось инфильтрацией листьев агробактериальным штаммом. Полученные с помощью транзientной экспрессии препараты вирусоподобных частиц M2e - HBs в последующем очищали методом зонального центрифугирования и использовали для внутрибрюшинной иммунизации лабораторных мышей. В результате испытаний было показано, что вирусоподобные частицы M2e - HBs обладают иммуногенными свойствами и обеспечивают защиту иммунизированных мышей от летальных доз вируса гриппа (Равин и др., 2012).

Таким образом, большая часть исследователей сконцентрировала внимание на разработке вакцин с использованием пептида M2e, слитого с разнообразными носителями, такими как бычий сывороточный альбумин, глутатион-S-трансфераза, флагеллин и так далее (Ebrahimi et al., 2011). Большинство работ показывает, что пептид M2e способен вызывать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ (Schotsaert et al., 2009). Полученные результаты позволили начать работы по коммерческому внедрению «универсальной» противогриппозной вакцины на основе пептида M2e. Так, уже в 2007 году четыре компании объявили о начале первой фазы клинических испытаний анти-M2 вакцин: Acambis Inc. (Cambridge, Великобритания), Cytos Biotechnology (Schlieren, Швейцария), Merck & Co Inc. (США), и VaxInnate Corp. (Нью-Джерси, США). Два генетически (M2e-HBVs (коровый белок вируса гепатита В) и M2e-флагеллин) и два химически (M2e-Q β phage и M2e-OMPС (outer membrane protein complex)) слитых белка проверяются на безопасность, иммуногенность и переносимость (Schotsaert et al., 2009; Ebrahimi et al., 2011). Корпорация VaxInnate Corp. после окончания первой фазы клинических испытаний универсальной вакцины, основанной на рекомбинантном белке M2e-флагеллин, объявила, что исследуемый препарат в концентрации 0,3 - 1,0 доз LG безопасен и хорошо переносится во всех группах здоровых молодых добровольцев в возрасте 18-49 лет. M2e-флагеллин универсальная противогриппозная вакцина вызывала иммунных ответ у 75% вакцинированных добровольцев после первой дозы и у 96% после второй дозы. В настоящее время, VaxInnate приступила к фазе II клинических исследований данной вакцины (http://www.vaxinnate.com/pages/pressreleases/20081026_001.htm).

2 Материалы и методы

2.1 Используемые штаммы и плазмиды

Список штаммов микроорганизмов и плазмид, используемых и полученных в данной работе приведен в таблице 10.

Таблица 10 - Штаммы и плазмиды

| Штаммы/плазмиды | Описание | Источник |
|--|--|--|
| <i>E. coli</i> DH5α | <i>F⁻gyr A96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 glnV44 deoR Δ(lacZYA-argF)U169[φ80d Δ(lacZ)M15]</i> | «Fermentas», Литва |
| BL21(DE3) | <i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λDE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i> | «New England BioLabs», Великобритания |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CBE21 | сконструирован на основе дикого штамма <i>A. tumefaciens</i> с Ti-плазмидой pTiBo542. | Ревенкова и др. 1994 |
| pUC19/18 | Мультикопийные плазмиды, размером 2686 н.п., основные элементы: <i>rep bla lac Δ(lacZ)</i> | «Fermentas», Литва |
| pTYB11 | Вектор размером 7412 н.п., основные элементы: <i>rop bla lacI SceCBDintein M13ori</i> | «New England BioLabs», Великобритания |
| pBI121 | Экспрессионный бинарный вектор размером 15300 н.п., основные элементы: <i>Nos-pro NPTII Nos-ter CaMV 35S GUS</i> | «ClonTech», США |
| pTYB11RBC | Вектор pTYB11 с клонированным геном субъединицы Б рицина | Данная работа |
| pUC19M143 | Вектор pUC19, с клонированным 5' - фрагментом гена M2 | Данная работа |
| pUC18RTB | Вектор pUC18 с клонированным геном субъединицы Б рицина | Данная работа |
| pUC18PR1 | Вектор pUC18, с клонированным 5' - фрагментом гена PR1 табака | Данная работа |
| pBIM2 | Вектор pBI121 с клонированным вместо гена GUS 5' - фрагментом гена M2 | Данная работа |

| | | |
|---------------------|--|---------------|
| pBIM143(M130, M122) | Вектор pBI121 с клонированными 5' - фрагментами гена M2 в трансляционном слиянии с геном GUS | Данная работа |
| pBIspRBM130 | Вектор pBI121 с клонированным 5' - фрагментом гена M2 в трансляционном слиянии с генами RTB, CBD и spPR1 | Данная работа |

2.1.1 Культивирование бактерий

Штаммы *E. coli* и *A. tumefaciens* выращивали при температуре 37°C и 28°C, соответственно, на жидкой или агаризованной питательной среде LB следующего состава: 10 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl, для агаризованной среды - 9 г/л агара, pH 7-7,2 (Маниатис и др., 1984). Среды стерилизовали автоклавированием при 121°C в течение 30 минут при давлении 1 атм. Культуры бактериальных штаммов хранили при -70°C в среде LB с добавлением глицерина до 30%. Для выращивания трансформированных бактериальных штаммов в среду добавляли антибиотики в концентрации ампицилина – 100 мкг/мл, канамицина – 25 мкг/мл для *E. coli* и канамицина – 50 мкг/мл для *A. tumefaciens*.

2.2 Оптимизация кодонного состава.

Сборка синтетических олигонуклеотидов

Оптимизация кодонного состава синтезируемого 5'-фрагмента гена M2 была выполнена с помощью программы DNA2.0 Gene Designer (DNA2.0, USA). При расчетах были использованы данные о частотах встречаемости кодонов в растениях *Lemna gibba* из базы данных. Для синтеза последовательности ДНК, кодирующей пептид M143, был выбран метод лигирования перекрывающихся олигонуклеотидов. Дизайн набора перекрывающихся олигонуклеотидов был произведен с использованием программы Gene2Oligo (Rouillard et al., 2004), термодинамический анализ полученных олигонуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы GeneRunner. Химический синтез олигонуклеотидов

был выполнен фирмой “Синтол” (Москва). Последовательность фрагментов приведена в таблице 11. Сборка синтезируемой последовательности велась в буфере, содержащем 50 mM Трис-НСl, рН7,5; 500 mM NaCl; 5 mM EDTA, рН8,0; 50 pmol каждого олигонуклеотида; объём реакционной смеси составлял 100 мкл. Лигирование собранных олигонуклеотидов проводили в течение 12 часов при температуре 23°C в буфере следующего состава: 40mM Tris HCl, рН 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM АТР, 5 единиц Т4 DNA лигазы, Н₂О до 100 мкл. ДНК осаждали 2 объёмами 96% этанола, промывали в 70% этаноле и растворяли в 30 мкл воды.

Таблица 11 - Последовательность синтетических олигонуклеотидов, использованных при получении 5'-фрагмента гена M2

| Наименование | Последовательность |
|--------------|---|
| R0 | 5'-AGGGACATCTGCAGATCAG-3' |
| F0 | 5'- CTGATCTGCAGATGTCCCTCCTCACTGAAGTCGAAACT-3' |
| R19 | 5'- ACTCCCATTCATTTCTAGTAGGAGTTTCGACTTCAGTGA GG-3' |
| F38 | 5'- CCTACTAGAAATGAATGGGAGTGCAGATGCTCTGATTCC A-3' |
| R60 | 5'-ACCACCAAGGGGTCGCTGGAATCAGAGCATCTGC-3' |
| F78 | 5'-GCGACCCCTTGGTGGTGGCGGGCGTCCATCATC-3' |
| R94 | 5'-TGAGATGCAGGATGCCGATGATGGACGCCGCC-3' |
| F110 | 5'-GGCATCCTGCATCTCATCCTCTGGATCCTCctt-3' |
| R126 | 5'- <u>tgggcagaatgatcttttetaaag</u> GAGGATCCAGAGGA-3' |
| R143 | 5'- <u>tagaaaagatcattctgcca</u> -3' |

Подчеркнуты нуклеотиды, добавленные для оптимизации температуры отжига олигонуклеотидов программой Gene2Oligo, которые были удалены при клонировании.

2.3 Молекулярное клонирование фрагментов ДНК

2.3.1 Амплификация фрагментов ДНК

Амплификацию фрагментов ДНК проводили с использованием *Pfu* ДНК-полимеразы (“Fermentas”, Литва) в количестве 0,5 единиц на реакцию, в буфере следующего состава: 1x буфер для ПЦР с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (“Fermentas”, Литва), содержащий 2 мМ MgSO_4 и 0,2 мМ каждого dNTP. Праймеры, синтезированные фирмой «Синтол» (Москва), добавляли в реакционную смесь в концентрации 0,2 пМ/мкл каждого. Для каждой пары праймеров предварительно подбирали оптимальную температуру отжига (таблица 12). В качестве матрицы для ПЦР использовали плазмиды pUC19M143 (для амплификации фрагментов M143, M130, M122), pTYB11 (клонирование хитинсвязывающего домена хитиназы A1 *Bacillus circulans*), а так же тотальную ДНК, выделенную из листьев клещевины (для клонирования субъединицы Б рицина) или табака (клонирование N-концевого сигнального пептида белка PR1). Объем реакционной смеси составлял 50 мкл. ПЦР анализ проводили на приборе MasterCycler Gradient («Eppendorf», Германия). Режим амплификации был следующим: предварительная денатурация 95⁰С, 5 мин; денатурация 95⁰С, 30 сек; отжиг праймеров 30 сек при температуре, соответствующей каждой паре; элонгация - при 72⁰С, время – исходя из расчета две минуты для 1000 п.о., 30 циклов амплификации. Полученные ДНК-фрагменты очищали с помощью фенола, насыщенного 100мМ Tris -HCl, pH 8,0 и осаждали двумя объемами 96% этилового спирта в присутствии 1/10 объема 3М ацетата калия pH 4,5. Осадки промывали несколько раз 70% этанолом, подсушивали в токе воздуха и растворяли в 25 мкл деионизированной воды.

2.3.2 Гидролиз векторов и фрагментов ДНК

Гидролиз фрагментов ДНК и векторов проводили с использованием ферментов рестрикции и соответствующих им буферных растворов производства компаний “Fermentas” (Литва) и «СибЭнзим» (Россия) в условиях, рекомендуемых изготовителем.

Таблица 12 - Список праймеров, использованных в работе

| Обозначение | Последовательность (5'→3') | Т°С отж. | Назначение праймера |
|----------------------------|--|-------------|---|
| M2_for M2_rev | atagagctcttagaggatccagaggat atttctagaatgtccctcctcactgaag | 64°C | Клонирование 5'-фрагмента M2 в векторе pBI121 по сайтам <i>SacI</i> и <i>XbaI</i> |
| M2-130for M122R | catctagaatgtccctcctcactgaag ccggggatccggaatcagagcatctgcac | 62°C | Клонирование 22 а. о фрагмента M2 в трансляционном слиянии с β-глюкуронидазой в векторе pBI121 по сайтам <i>XbaI</i> и <i>BamHI</i> |
| M2-130for M2-130rev | catctagaatgtccctcctcactgaag gggatcccgccgccaccaccaaggggt | 62°C | Клонирование 30 а. о фрагмента M2 в трансляционном слиянии с β-глюкуронидазой |
| M2-143for M2-143rev | cgctctagaatgtccctcctcactgaag atttccctggaggatccagaggatgagatg | 59°C | Клонирование 43 а. о фрагмента M2 в трансляционном слиянии с β-глюкуронидазой |
| uidA_low | gaatcctttgccacgcaagtccgcattt | 63°C | Праймер на внутреннюю последовательность гена GUS |
| RTB_F RTB_R | cgtctagagctgatgtttgtatggatcctgag cgtgagctcctgcaagagagtaatctgtctatca | 63°C | Клонирование субъединицы Б рицина в векторе pUC18 |
| RBin_F RBin_R | gtcgactctagaaccgggtgctgatgtttgtatgga ccgttaatctagaaaataatggtaacatatttgg | 62°C | Клонирование субъединицы Б рицина в трансляционном слиянии с M130 в векторе pBI121 |
| CBD_for CBD_rev | agaggatccacgacaaatcctggtgtatc ttcgagctctcattgaagctgccacaaggc | 59°C | Клонирование хитинсвязывающего домена (CBD) в векторе pBI121 |
| PR1_F PR1_R | atcggatcctctataaatacccttgg aatgagctctacacctacatctgcacg | 58°C | Клонирование 5' фрагмента гена белка PR1 табака в векторе pUC18 |
| RBsp_F RBsp_R | agaaccgggtatgggatttgtctcttttc agcaccggtagaatttgggcaagg | 57°C | Клонирование гена сигнального пептида белка PR1 табака в слиянии с геном субъединицы Б рицина в векторе pBI121 |
| RBC_F RBC_R | gtacagaacagaagagctgctgatgtttgtatggatc tcgaggaattcaccgagagggtaaagaagaatg | 62°C | Клонирование субъединицы Б рицина в векторе pTYB11 |
| oligo(dT) ₁₂₋₁₈ | ttt-ttt-ttt-ttt-ttt-ttt | 37°C | Праймер для обратной транскриптазы |
| VirC1 VirC2 | gcactatctacctaccgctacgtcatc gttgtegatcgggactgtaaattgtg | 59°C | Праймеры на <i>virC2</i> -ген Ti-плазмиды агробактерий |
| 5727 | aagggatgacgcacaatc | 56°C | Прямой праймер к 35S CaMV промотору вектора pBI121 |
| T7UnPr | taatacgaactcactatag | 56°C | Праймер к T7 промотору вектора pTYB11 (сиквенс вставки) |

2.3.3 Лигирование

Лигирование гидролизованных ПЦР - фрагментов и вектора проводили при 16°C в течение 18 часов в буфере следующего состава: 40 mM Tris HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM АТФ с использованием одной единицы ДНК-лигазы фага T4 ("Fermentas", Литва). Объем реакционной смеси составлял 10 мкл. По истечении времени, лигазную смесь прогревали при 65°C в течение 20 минут для денатурации фермента и использовали для трансформации клеток *E.coli* штамма DH5 α .

2.4 Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля

Элюцию фрагментов ДНК проводили согласно методике, описанной Маниатисом с соавторами (Maniatis et al., 1982). Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в 1% легкоплавкой агарозе LMP («FMC BioProducts», США), растворенной в однократном буфере TAE. Далее вырезали кусочек геля с необходимым фрагментом, помещали его в пробирку и нагревали при температуре 60°C. К расплавленному гелю добавляли три объема буфера TE, тщательно перемешивали и обрабатывали смесь равным объемом фенола, насыщенного 100mM Tris -HCl, pH 8,0. Разделение фаз проводили центрифугированием при 12000g. ДНК осаждали двумя объемами 96% этилового спирта в присутствии 1/10 объема 3M ацетата калия. Осадки промывали несколько раз 70% этанолом, подсушивали в токе воздуха и растворяли в небольшом объеме деионизированной воды

2.5 Трансформация *Escherichia coli*

Клетки *E.coli* трансформировали лигазной смесью или плазмидами по методике, описанной Маниатисом с соавторами (Maniatis et al., 1982), с использованием хлорида кальция. Ночную культуру *E.coli* переносили в среду LB в разведении 1:100 и выращивали при 37°C с аэрацией до оптической плотности A₆₀₀=0,6 ОЕ. Клетки осаждали центрифугированием при 3500g, к осадку добавляли равное объему культуральной среды количество раствора 70mM CaCl₂ в 10mM Трис-НCl pH 7.0 и инкубировали на льду в течение 30 минут. Далее клетки осаждали,

ресуспендировали в том же растворе хлорида кальция в соотношении 1:100, добавляли 5 мкл лигазной смеси или 10-100нг плазмидной ДНК и выдерживали на льду еще 30 минут. По истечении времени, клетки подвергали воздействию теплового шока (42⁰С в течение 2-х минут, затем 5 минут при 0⁰С), добавляли жидкую среду LB до одного миллилитра и подращивали в течение часа при 37⁰С. Трансформанты высевали на чашки с агаризованной средой LB, содержащей селективный антибиотик и, в отдельных случаях, X-gal и ИПТГ, и культивировали 18 часов при 37⁰С.

2.6 Перенос плазмидной ДНК в штаммы *Agrobacterium tumefaciens*

Перенос плазмидной ДНК в агробактериальные штаммы проводился по методу, используемому для трансформации *E.coli* с изменениями: концентрация хлорида кальция в растворах составляла 20 мМ, во избежание элиминации Ti-плазмиды перед тепловым шоком клетки подвергались быстрому замораживанию в жидком азоте, тепловой шок проводился при 37⁰С.

2.7 Выделение плазмидной ДНК из клеток *Escherichia coli*.

Выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli* проводили с помощью стандартного метода щелочного лизиса в соответствии с протоколом, описанным Маниатисом с соавторами (Maniatis et al., 1982). Для сиквенационного анализа плазмидную ДНК выделяли с помощью набора реагентов Quantum Plasmid MiniPrep Kit производства компании «BioRad» (США), согласно прилагаемым протоколам.

2.8 Электрофоретический анализ ДНК

Электрофоретическое разделение ДНК проводили по Маниатису с соавторами (Maniatis et al., 1982) в 0,9-2,5% агарозных гелях, с добавлением бромистого этидия, в 0,5х буфере TAE (0,04М Трис-ацетат, 0,002М ЭДТА). Фрагменты ДНК разделяли в электрофорезной камере «BioRad» (США) при 120Вт. В лунку вносили от 5 до 15 мкл образца, предварительно смешанного с буфером для нанесения проб (бромфеноловый синий 0,25%, глицерин 30% в Н₂О). Визуализацию ДНК после разделения проводили в трансиллюминаторе в проходящем ультрафиолетовом свете.

2.9 Трансформация растений табака

Растения табака *Nicotiana tabacum* сорта *L. cv. Petite Havana SR1* выращивали в условиях *in vitro* на безгормональной питательной среде Мурасиге и Скуга, MS (Murashige and Skoog, 1962) при следующих условиях: фотопериод – 16/8 часов, температура – 23-25⁰С, освещенность – 3000-3500 люкс.

Трансформация растений табака осуществлялась по методу Хорша (Horsch, 1985) следующим образом. Агробактериальный штамм, содержащий целевую плазмиду, был выращен в 50 мл жидкой среды LB с селективным антибиотиком при 28⁰С до оптической плотности $A_{600}=0,4 - 0,6$ ОЕ, осажден центрифугированием при 2900g в течение 15 минут, дважды промыт жидкой средой MS и суспендирован в 50 мл той же среды. Листовые пластины табака были нарезаны на экспланты размером 1 x 1 см и помещены в агробактериальную суспензию на 30 мин. Далее экспланты подсушивались в ламинаре в течение 5 минут на чашке Петри с фильтровальной бумагой и переносились на агаризованную питательную среду MS, содержащую 1 мг/л ВАР и 0,1 мг/л ИУК. Кокультивация с агробактериями проводилась при 26⁰С в течение 3-х дней в темноте. После кокультивации, экспланты были перенесены на агаризованную гормональную питательную среду MS (ВАР 1 мг/л, ИУК 0,1 мг/л) с добавлением 70мг/л канамицина и 200 мг/л тиментина, на которой оставались в течение 2-х недель при 26⁰С в темноте до появления регенерантов. Образовавшиеся регенеранты были перенесены на селективную гормональную питательную среду MS (0,5 мг/л ВАР, 70мг/л канамицина, 200мг/л тиментина) для индукции побегообразования. В последующем сформированные отдельные линии регенерантов были укоренены на селективной безгормональной среде MS, содержащей 100 мг/л канамицина и переданы в теплицу для последующего роста. Растения высаживались в субстрат, состоящий из смеси торфа и песка в соотношении 1:1, и культивировались в условиях зимней теплицы при температуре 20-25⁰С и естественном освещении с дополнительной подсветкой в ночные часы.

2.10 Трансформация растений ряски

Трансформация растений ряски (*Lemna minor*) проводилась сотрудниками лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) под руководством с.н.с. к.б.н. Митюшкиной Т.Ю. по разработанной ранее оригинальной методике.

2.11 Выделение тотальной ДНК из растительных тканей

Для выделения растительной геномной ДНК использовали листовые пластинки табака или целые растения ряски, предварительно подсушенные на фильтровальной бумаге. Выделение проводили с помощью СТАВ-буфера по методу Роджерса с соавторами (Rogers et al., 1994). Навеску растительной ткани (100 мг) растирали в жидком азоте, ресуспендировали в 600 мкл 2хСТАВ буфера следующего состава: 100mM TrisHCl, pH 8.0; 1,4 M NaCl; 20mM EDTA; 2% (w/v) СТАВ; 1% поливинилпирролидон (Mr=40.000) и инкубировали 15 минут при 65°C. К суспензии добавляли 600 мкл хлороформа и перемешивали. Разделение фаз проводили с помощью центрифуги "Eppendorf" 5418 (Германия) в течение 15 минут при 16000 g. Водную фазу переносили в новую пробирку, к осадку добавляли 200 мкл 2хСТАВ буфера и повторяли экстракцию. Полученные водные фазы из двух циклов экстракции объединяли в одну, и перемешивали с 800 мкл хлороформа. После разделения фаз центрифугированием, к водной фазе добавляли 600 мкл изопропанола и инкубировали 30 минут при -70°C. Далее нуклеиновые кислоты осаждали центрифугированием при 16000 g. Осадок промывали 70% (2 раза) и 96% этанолом, подсушивали в токе воздуха и растворяли при 65°C в 400 мкл высокосолевого ТЕ-буфера следующего состава: 10mM TrisHCl, pH8.0, 1mM EDTA, 1M NaCl. К раствору добавляли два объема 96% этанола и инкубировали ночь при -20°C. ДНК осаждали центрифугированием при 16000 g, осадок промывали 70% и 96% этанолом, подсушивали в токе воздуха и растворяли в 100 мкл деионизированной воды. Качество выделенной ДНК оценивали с помощью электрофоретического разделения в 0,9% агарозном геле в однократном ТАЕ-буфере.

2.12 ПЦР - анализ растительной ДНК

ПЦР - анализ препаратов растительной ДНК проводили в термоциклере MasterCycler Gradient («Eppendorf», Германия). Реакционная смесь содержала буфер для ПЦР с 20мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2мМ MgCl_2 , 0,2мМ dNTP производства «Fermentas» (Литва), праймеры в концентрации 0,5 μM каждого, 0,2 ед. акт/мкл Taq-полимеразы («Fermentas», Литва) и 2-5 мкл препарата тотальной ДНК растений. Объем реакционной смеси для каждой пробы составлял 25 мкл. Режим амплификации был следующим: предварительна денатурация 95 $^\circ\text{C}$, 5 мин; денатурация 95 $^\circ\text{C}$, 30 сек; отжиг праймеров 30 сек при температуре, соответствующей каждой паре; элонгация - при 72 $^\circ\text{C}$, время – исходя из расчета одна минута для 1000 п.о., 25 циклов амплификации. Полученные ПЦР – фрагменты в последующем анализировались электрофоретическим разделением в 1-2,5% агарозном геле.

2.13 Выделение тотальной РНК из растительных тканей и ОТ-ПЦР - анализ трансгенных растений

Выделение тотальной РНК растений проводили с использованием набора реактивов QuantumPrep AquaPure RNA Isolation Kits («Bio-Rad», США) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Для дополнительной очистки полученной РНК от примесей ДНК препараты обрабатывались ДНКазой («Fermentas», Литва). Отсутствие ДНК-примесей проверяли с помощью ПЦР-анализа полученных образцов с использованием Taq-полимеразы («Fermentas», Литва) и праймеров на целевые последовательности. Свободные от примесей образцы РНК использовали для получения кДНК с помощью обратной транскриптазы M-MuLV RT («Fermentas», Литва) и праймера oligo(dT)₁₂₋₁₈ в качестве затравки (таблица 12) в условиях, рекомендованных для данного фермента производителем. В последующем полученные препараты кДНК были проанализированы методом ПЦР на наличие целевых последовательностей с использованием соответствующих праймеров (таблица 12).

2.14 Гистохимический анализ трансгенных растений

Гистохимическое определение активности β -глюкуронидазы проводилось по методике, описанной Джеферсоном с соавторами (Jefferson et al., 1987) с использованием 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронида (X-GLUC, «Fermentas»). Растительную ткань помещали в буфер, содержащий 50 мМ NaPO₄, pH 7.0, 10 мМ Na₂EDTA, 0.1% тритон X-100, 1 мг/л X-GLUC, инкубировали при 37⁰С и далее промывали в 70% и 96% этаноле. Оценку интенсивности окрашивания тканей проводили спустя 4, 8 и 18 часов после начала анализа. Окрашенные ткани хранили при 4⁰С в 96% этаноле.

2.15 Выделение общего растворимого белка из растительных тканей

Для экстракции тотального белка из растений использовали листья табака или целые растения ряски, предварительно подсушенные на фильтровальной бумаге. Навеску растительной ткани растирали в жидком азоте, переносили в экстракционный буфер PPEB, содержащий 30мМ Tris-HCl, pH8.0; 10мМ ЭДТА; 3мМ β -меркаптоэтанола, 1% SDS, 10% глицерина, 4 мкг/мл апротинина, 4 мкг/мл лейпептина или смесь ингибиторов протеиназ («Amersham», США), в соотношении ткань: буфер 1:4. Экстракцию белка проводили при комнатной температуре в течение 40 минут при постоянном перемешивании. Растительный дебрис осаждали центрифугированием при 16000g, супернатант переносили в отдельную пробирку и использовали в последующих анализах, в случае необходимости хранили при -20⁰С.

2.16 Определение количества белка в растительных препаратах

Определение количества белка в растительных экстрактах проводили по модифицированной методике Лоури (Lowry et al., 1951), с использованием набора реагентов «DC Protein Assay», компании «BioRad» (США), согласно прилагаемой инструкции. Измерение оптического поглощения в препаратах проводили с помощью спектрофотометра «Biotrak II Plate Reader» («Amersham Biosciences», Великобритания) при длине волны в 620 нм. Для построения калибровочного графика использовали раствор БСА («Sigma», США) в экстракционном буфере в диапазоне концентраций 0,2 - 1,4 мг/мл.

2.17 Вестерн-блот анализ общего растворимого белка трансгенных растений

Электрофоретическое разделение растительных белков проводили в 10% SDS-ПААГ по методу Лемли (Laemmly, 1970), на каждую дорожку наносили по 90 мкг белка. После электрофореза протеины переносили на нитроцеллюлозную мембрану «BioRad» (США) методом электропереноса с использованием камеры Hoefer TE22 («Amersham», США) согласно инструкции фирмы-производителя. Мембраны блокировали в 4% обезжиренном молоке («BioRad», США), растворенном в фосфатном буфере PBS с добавлением 0,05% Tween-20, в течение одного часа при комнатной температуре. Гибридизацию с первичными антителами проводили при 4°C в течение 18 часов. Для детекции пептида M2e были использованы кроличьи антитела («Abcam», Великобритания) разведенные в блокировочном буфере в соотношении 1:500, β-глюкуронидазы - кроличьи антитела, узнающие С-концевой участок с 589 по 603 а.о. («Sigma», США) в разведении 1:1000, субъединицы Б ригина - кроличьи поликлональные антитела («Abcam», Великобритания) в разведении 1:1000. В качестве вторичных антител использовали антикроличьи IgG, конъюгированные со щелочной фосфатазой («Pierce», США) или с пероксидазой хрена («BioRad», США), разведенные в блокировочном буфере в соотношении 1:3000. Гибридизацию с вторичными антителами проводили в течение 1 часа при комнатной температуре. Изображение на мембранах в случае использования щелочной фосфатазы получали с помощью хромогенного субстрата BCIP/NBT («Fermentas», Литва), или, при использовании пероксидазы хрена, на рентгеновской плёнке PM-1 с помощью люминесцентного субстрата ECL («General Electric Health Care», США) согласно инструкциям фирм-производителей.

2.18 Количественный иммуоферментный анализ слитого белка

M130-β-глюкуронидаза в трансгенных растениях

Для количественного анализа уровня экспрессии слитого белка M130-β-глюкуронидаза в растениях использовали метод твердофазного иммуоферментного анализа тотальных белковых экстрактов. В лунки полистироловой платы «flat-botton» («Greiner bio-one», Германия) вносили по 200 мкл растительного белкового

экстракта в буфере PPEB без SDS (п.2.13), и инкубировали при 37°C в течение 2-х часов. Затем платы промывали на термошейкере PST-60HL-4 («BioSan», Латвия) при 600 оборотов в минуту буфером PBST (фосфатный буфер с добавлением 0,05% Tween-20) при 37°C три раза по пять минут. Блокирование лунок проводили в течение одного часа при 37°C, с использованием 2% раствора БСА в буфере PBST. Далее в лунки вносили кроличьи поликлональные антитела к β-глюкуронидазе («Sigma», США) в разведении 1:500 и инкубировали в течение 18 часов при 4°C. Антитела, не связавшиеся с образцами, отмывали в буфере PBST при 37°C (три раза по 5 минут). К полученным препаратам добавляли антикроличьи иммуноглобулины, конъюгированные со щелочной фосфатазой («Pierce», США) в разведении 1:2000, инкубировали в течение часа при 37°C. Для разведения антител, использовали блокировочный буфер. После отмывки образцов от вторичных антител, в лунки добавляли субстрат для щелочной фосфатазы «Phosphatase Substrate Kit» («Pierce», США) и инкубировали в условиях, рекомендованных фирмой производителем. После развития окраски реакцию останавливали, измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра «Biotrak II Plate Reader» («Amersham Biosciences», Великобритания) при длине волны в 405 нм и оценивали процентное содержание целевого белка. Для построения калибровочного графика использовали β-глюкуронидазу производства компании «Sigma» (США), предварительно растворенную в фосфатном буфере («Хеликон», Россия) до концентрации от 5 до 100 нг на 100 мкл.

2.19 Оценка содержания субъединицы Б рицина в растительных экстрактах с помощью асиалофетуина

Определение содержания субъединицы Б рицина в трансгенных растениях проводили согласно методике, описанной Давсоном с соавторами (Dawson et al., 1999). Асиалофетуин («Sigma», США) был растворен в деионизированной воде в концентрации 400 мкг/мл и хранился при температуре -20°C. Перед использованием асиалофетуин разводили до концентрации 4мкг/мл в 0,1М карбонат/бикарбонатном буфере pH 9,6 (3,18 г/л Na₂CO₃, 5,86 г/л NaHCO₃, «РеаХим», СССР). Полученный

раствор наносили на иммунологическую плашку «flat-botton», производства «Greiner bio-one» (Германия) по 100 мкл на лунку. Инкубацию проводили при 4°C в течение 18 часов. Далее лунки промывали буфером PBST (буфер PBS («Хеликон», Россия) с добавлением 0,05% Tween-20 («BioRad», США)) три раза по пять минут со скоростью 600 об/мин на термошейкере PST-60HL-4 («BioSan», Латвия) при температуре 37°C. Блокирование лунок проводили в течение одного часа при 37°C, с использованием 1% раствора БСА («Sigma», США) в буфере PBST. Непосредственно перед нанесением в лунки иммунологической платы, проводили выделение белка из растертых в жидком азоте растительных тканей. Белок экстрагировали в буфере PBST в соотношении вес/объем 1:1, при температуре 4°C в течение 40 минут. Растительную ткань осаждали центрифугированием при 16000 g, супернатант отбирали и вносили по 100 мкл на лунку в платы с иммобилизованным асиалофетуином. Инкубацию образцов вели в течение часа при 37°C. По истечении времени, не связавшиеся с асиалофетуином белки отмывали при 37°C буфером PBST (три раза по пять минут). Далее в лунки вносили кроличьи поликлональные антитела к субъединице Б рицина («AbCam», Великобритания) или к пептиду M2e («AbCam», Великобритания), инкубировали, отмывали буфером PBST три раза по пять минут и добавляли антикроличьи IgG, конъюгированные со щелочной фосфатазой («Pierce», США). Антитела разводили в блокировочном буфере в соотношении 1:1000 для первичных и 1:2000 для вторичных антител и вносили по 100 мкл раствора на лунку. Инкубацию с антителами проводили в течение часа для каждого на термошейкере PST-60HL-4 со скоростью 600 об/мин при температуре 37°C. После отмывки от вторичных антител, в лунки вносили субстрат для щелочной фосфатазы («Phosphatase Substrate Kit», «Pierce», США). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 5-15 минут, оптическую плотность препаратов измеряли при длине волны 405 нм с помощью спектрофотометра «Biotrak II Plate Reader» («Amersham Biosciences», Великобритания).

2.20 Экспрессия субъединицы Б рибосомы в бактериальной системе

Плазмида pTYB11RBC была перенесена в экспрессионный штамм *E.coli* BL21(DE3) («New England BioLabs», Великобритания) методом прямой трансформации (Маниатис с соавт., 1982). Трансформанты, выросшие на агаризованной среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампицилина, были посеяны в жидкую селективную среду LB и выращены на качалке при 37°C до оптической плотности OD_{600} 0,5-0,6 ед. Индукцию экспрессии гена RTB проводили добавлением в культуральную среду ИПТГ до концентрации 0,5 мМ. Индуцированные культуры растили на качалке при 28°C в течение ночи. Далее бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 8000 g в течение 20 мин, осадки замораживали и хранили при -70°C. Электрофоретический анализ экспрессии гена RTB проводили по Лемли (Laemmli, 1970) в 10% денатурирующем полиакриламидном геле. Гели окрашивали краской Кумасси G-250, с последующей отмывкой в горячей воде.

3 Результаты и обсуждения

3.1 Сравнительный анализ кодонного состава вируса гриппа А H5N1 и растений ряски

Нуклеотидная последовательность белка М2 вируса гриппа птиц H5N1 штамма A/Chicken/Kurgan/5/2005 (GenBank DQ449633.1) была любезно предоставлена к.м.н. Грудининым М.П. - зав. лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии НИИ Гриппа РАМН г. Санкт-Петербург (директор НИИ академик РАМН, д. б. н., профессор Киселев О.И.). Одним из основных условий для повышения уровня экспрессии гетерологичных генов является оптимизация их кодонного состава. С этой целью нами было проведено сравнительное изучение кодонного состава гена матричного протеины М1 вируса гриппа птиц H5N1 Kurgan/05/2005, генов ряски малой (*Lemna minor*) и ряски горбатой (*Lemna gibba*). Существующие в настоящее время сведения о частотах использования кодонов в ряске малой являются нерепрезентативными (получены на основе анализа четырех CDS), поэтому для анализа кодонного состава генов рясковых нами были использованы данные о частоте использования кодонов в геноме лучше изученной ряски горбатой (*Lemna gibba*).

Известно, что частота использования кодонов может различаться даже между близкородственными видами. В результате сравнения частоты встречаемости кодонов у ряски горбатой и ряски малой было показано, что частоты использования триплетов различаются незначительно (таблица 13). Например, наиболее часто встречаемым триплетом, кодирующем тирозин, в геномах обоих видов является TAC, цистеин - TGC, аргинин - триплеты AGA и CGC. Наибольшее различия наблюдаются в частоте встречаемости стоп-кодонов, Так, частота использования кодона TAG в геноме ряски гиббы составляет всего 0,06, тогда как частота встречаемости этого триплета в геноме ряски малой составляет 0,25. В то же время частоты использования кодонов у рясковых и в гене матричного протеины М1 вируса гриппа птиц H5N1 Kurgan/05/2005 сильно различаются.

Таблица 13 - Сравнение частот использования кодонов в геномах растений ряски малой (*Lemna minor*), ряски горбатой (*Lemna gibba*) и генах матричного белка 1 (M) вируса гриппа птиц H5N1 A/chicken/Kurgan/05/2005

| Аминокислота | Кодон | Частота использования кодонов в геноме <i>Lemna gibba</i> | Частота использования кодонов в геноме <i>Lemna minor</i> | Частота использования кодонов в генах матричного белка 1 (M) вируса гриппа птиц H5N1 A/chicken/Kurgan/05/2005 |
|--------------|------------|---|---|---|
| Ala | GCA | 0,12 | 0,18 | 0,31 |
| | GCC | 0,48 | 0,28 | 0,27 |
| | GCG | 0,27 | 0,23 | 0,12 |
| | GCT | 0,13 | 0,31 | 0,31 |
| Arg | AGA | 0,25 | 0,27 | 0,47 |
| | AGG | 0,20 | 0,23 | 0,18 |
| | CGA | 0,08 | 0,08 | 0,18 |
| | CGC | 0,24 | 0,23 | 0,06 |
| | CGG | 0,17 | 0,14 | 0,06 |
| | CGT | 0,07 | 0,06 | 0,06 |
| Asn | AAC | 0,62 | 0,61 | 0,38 |
| | AAT | 0,38 | 0,39 | 0,62 |
| Asp | GAC | 0,61 | 0,57 | 0,00 |
| | GAT | 0,39 | 0,43 | 1,00 |
| Cys | TGC | 0,80 | 0,74 | 0,20 |
| | TGT | 0,20 | 0,26 | 0,80 |
| Gln | CAA | 0,37 | 0,31 | 0,00 |
| | CAG | 0,63 | 0,69 | 1,00 |
| Glu | GAA | 0,33 | 0,40 | 0,35 |
| | GAG | 0,67 | 0,60 | 0,65 |
| Gly | GGA | 0,21 | 0,26 | 0,44 |
| | GGC | 0,42 | 0,34 | 0,19 |
| | GGG | 0,25 | 0,28 | 0,19 |
| | GGT | 0,12 | 0,12 | 0,19 |
| His | CAC | 0,59 | 0,71 | 0,20 |
| | CAT | 0,41 | 0,29 | 0,80 |

| Аминокислота | Кодон | Частота использования кодонов в геноме <i>Lemna gibba</i> | Частота использования кодонов в геноме <i>Lemna minor</i> | Частота использования кодонов в генах матричного белка 1 (М) вируса гриппа птиц H5N1 A/chicken/Kurgan/05/2005 |
|---------------------|--------------|--|--|--|
| Ile | ATA | 0,13 | 0,05 | 0,20 |
| | ATC | 0,65 | 0,48 | 0,60 |
| | ATT | 0,21 | 0,47 | 0,20 |
| Leu | CTA | 0,04 | 0,06 | 0,23 |
| | CTC | 0,36 | 0,29 | 0,31 |
| | CTG | 0,27 | 0,24 | 0,23 |
| | CTT | 0,12 | 0,18 | 0,15 |
| | TTA | 0,07 | 0,06 | 0,00 |
| | TTG | 0,14 | 0,16 | 0,08 |
| Lys | AAA | 0,24 | 0,30 | 0,38 |
| | AAG | 0,76 | 0,70 | 0,62 |
| Met | ATG | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Phe | <i>TTC</i> | <i>0.81</i> | <i>0,67</i> | <i>0,43</i> |
| | <i>TTT</i> | <i>0.19</i> | <i>0,33</i> | <i>0,57</i> |
| Pro | CCA | 0,13 | 0,21 | 0,38 |
| | CCC | 0,35 | 0,29 | 0,25 |
| | CCG | 0,30 | 0,27 | 0,13 |
| | CCT | 0,21 | 0,22 | 0,25 |
| Ser | AGC | 0,20 | 0,18 | 0,12 |
| | AGT | 0,07 | 0,12 | 0,29 |
| | TCT | 0,15 | 0,16 | 0,24 |
| | TCA | 0,09 | 0,17 | 0,29 |
| | TCC | 0,31 | 0,21 | 0,06 |
| | TCG | 0,18 | 0,16 | 0,00 |
| Thr | ACA | 0,12 | 0,12 | 0,26 |
| | ACC | 0,44 | 0,42 | 0,26 |

| Аминокислота | Кодон | Частота использования кодонов в геноме <i>Lemna gibba</i> | Частота использования кодонов в геноме <i>Lemna minor</i> | Частота использования кодонов в генах матричного белка 1 (М) вируса гриппа птиц H5N1 A/chicken/Kurgan/05/2005 |
|--------------|------------|---|---|---|
| Thr | ACT | 0,18 | 0,22 | 0,32 |
| | ACG | 0,26 | 0,24 | 0,16 |
| Trp | TGG | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Tyr | TAC | 0,84 | 0,64 | 0,80 |
| | TAT | 0,16 | 0,36 | 0,20 |
| Val | GTA | 0,06 | 0,08 | 0,07 |
| | GTG | 0,38 | 0,40 | 0,40 |
| | GTT | 0,19 | 0,20 | 0,20 |
| | GTC | 0,37 | 0,33 | 0,33 |
| End | TGA | 0,56 | 0,75 | 1,00 |
| | TAG | 0,06 | 0,25 | 0,00 |
| | TAA | 0,39 | 0,0 | 0,00 |

Так, например, наиболее часто встречающимся кодоном цистеина в последовательности гена М1 гриппа птиц является триплет TGT, тогда как в геноме ряски малой и гиббы преобладает триплет TGC. Для кодирования гистидина в рясковых чаще встречается триплет САС, а в геноме вируса гриппа – САТ, фенилаланина -ТТС и ТТТ, соответственно. Таким образом, для обеспечения максимального уровня экспрессии генов вируса гриппа в растениях ряски необходимым этапом их синтеза являлась оптимизация кодонного состава. В результате, для расчета нуклеотидной последовательности генов вируса гриппа, экспрессируемых в ряске малой, была использована представленная таблица частот использования кодонов в геноме растений ряски горбатой (*Lemna gibba*).

3.2 Оптимизация кодонного состава 5'-концевой последовательности гена М2 вируса гриппа птиц H5N1. Синтез и сборка олигонуклеотидов

Для синтеза в трансгенных растениях был выбран аминотерминальный фрагмент белка М2 вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/5/05 H5N1 (GenBank DQ449633.1) длиной 43 аминокислотных остатка, включающий пептид М2е (с 1 по 22 а.о.), фрагмент далее обозначен как М143. Обратная трансляция аминокислотной последовательности М143 в нуклеотидную была проведена с учетом рассчитанных частот использования кодонов в растениях ряски малой (п.3.1.). Оптимизация кодонного состава синтезируемого фрагмента была выполнена с помощью программы DNA2.0 Gene Designer. Анализ ДНК-мотивов последовательности М143, выполненный с помощью программы Motif (<http://motif.genome.jp>), показал отсутствие нежелательных последовательностей, которые могут снижать уровень экспрессии целевых протеинов, таких как сигналы сплайсинга, сайты полиаденилирования и т.д. В результате, с учетом введения в экспрессируемую последовательность сайтов рестрикции *Pst*I, *Bam*HI и иницирующего метионина, была получена нуклеотидная последовательность 5'-фрагмента гена М2 вируса гриппа птиц, представленная на рисунке 7.

А. ***M*SLLE***VETPTR***NEWECRCSDSSDPLVVAASIIGILHLILWIL**

Б.

CTGATCTGCAGATG*TCCCTCCTCACTGAAGTCGAAACTCCTACTAGAAA***
TGAATGGGAGTGCAGATGC
TCTGATTCCAGCGACCCCTTGGTGGTGGCGGGCGTCCATCATCGGCATCCT
GCATCTCATCCTCTGGATCCTC**

Рисунок 7 - Аминокислотная (А) и нуклеотидная (Б) последовательности фрагмента M143 с оптимизированным для экспрессии в растениях ряски кодонным составом.

Подчеркнуты последовательности сайтов рестрикции *Pst*I и *Bam*HI, курсивом выделен наиболее вероятный антигенный эпитоп

Синтез нуклеотидной последовательности M143 был выполнен методом лигирования перекрывающихся олигонуклеотидов. Дизайн наборов перекрывающихся олигонуклеотидов был выполнен, как описано в п.2.2. главы «Материалы и методы». Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой «Синтол» (Москва), полностью деблокированы, фосфорилированы по 5'- концам, очищены в ПААГ и обессолены (таблица 11). Синтетические олигонуклеотиды в количестве 50 pmol каждого добавляли в буфер, состав которого указан в п.2.2. Общий объем реакционной смеси составлял 100 мкл. Смесь прогревали на водяной бане при 95°C в течение 6 мин, и оставляли медленно остывать в течение ночи до комнатной температуры. Сборка олигонуклеотидов проверялась методом электрофореза в 2,5% агарозном геле. При наличии в полученной реакционной смеси фрагмента рассчитанного размера 129 н.п., 1/10 объема смеси добавляли в буфер для лигирования. Лигирование проводили как описано в п.2.2. в течение 12 часов при температуре 23°C. Полученные препараты анализировали при помощи электрофореза в 2,5% агарозном геле. В результате были получены фрагменты ДНК ожидаемого размера (рисунок 8).



Рисунок 8 - Результат анализа сборки синтетических олигонуклеотидов M143

А- до лигирования. Б- после лигирования. М- ДНК- маркеры «Fermentas» серии “Low Range” (Литва). Стрелкой указан молекулярный маркер размером в 150 н.п. Ожидаемая длина фрагмента 129 н.п.

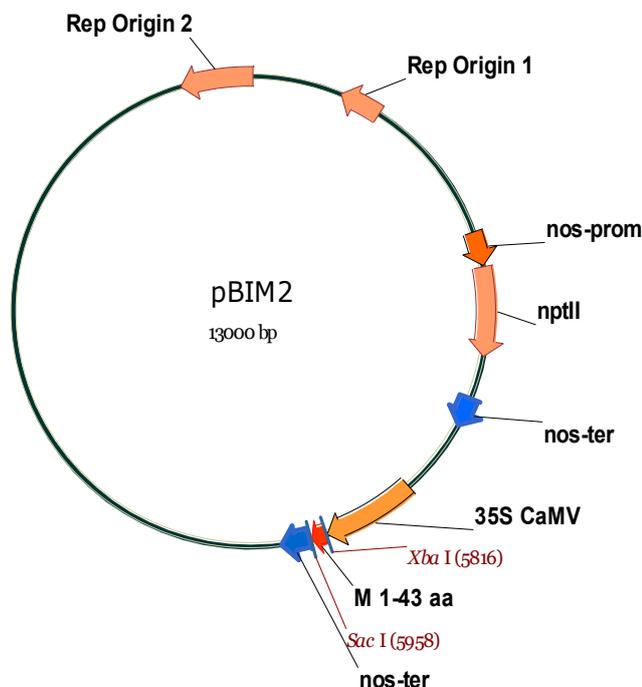
3.3 Клонирование 5'- фрагмента гена M2 в векторе pUC19 и в растительном экспрессионном векторе pBI121

Синтетическая последовательность M143 была клонирована в векторе pUC19, как описано в главе «Материалы и методы». Синтезированный фрагмент и вектор последовательно гидролизовали по сайтам рестрикции *Pst*I и *Bam*HI и лигировали с помощью ДНК-лигазы фага T4 согласно инструкции производителей ферментов. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма DH5 α , отбор трансформантов проводили при помощи бело-синего теста на среде, содержащей X-gal и ИПТГ. В результате ПЦР- анализа белых колоний с использованием пары праймеров к последовательности M143 M2_for и M2_rev (таблица 12), было отобрано 35 клонов, содержащих вектор pUC19 со вставкой фрагмента M143. Сиквенирование плазмидной ДНК 5-ти отобранных трансформантов, показало соответствие нуклеотидной последовательности M143 ожидаемой в трех клонах. Для последующей работы была использована одна из этих плазмид, обозначенная как pUC19M143.

Для проверки функциональности полученной синтетической последовательности 5'-фрагмента гена M2 в растениях, последовательность M143 была клонирована в растительном экспрессионном векторе. В качестве такового была выбрана плазида pBI121, содержащая последовательность гена β-глюкуронидазы (GUS) под контролем конститутивного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (35S CaMV). Нуклеотидная последовательность гена GUS была удалена при гидролизе вектора pBI121 рестриктазами *SacI* и *XbaI*. Последовательность M143 была амплифицирована с помощью пары праймеров M2_for и M2_rev (таблица 12) и вектора pUC19M143 в качестве матрицы. При амплификации в нуклеотидную последовательность M143 с помощью праймеров добавили стоп кодон TAA, а так же сайты рестрикции *XbaI* по 5'-концу и *SacI* по 3'-концу. Полученная последовательность и вектор pBI121 были гидролизированы рестриктазами *XbaI* и *SacI* и лигированы с использованием ДНК-лигазы фага T4 в условиях, рекомендованных производителями ферментов. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5α, трансформантов высевали на селективную среду LB, содержащую 25 мкг/мл канамицина. Отбор трансформантов проводили при помощи ПЦР - анализа выросших колоний с использованием праймеров 5727 и M2_rev (таблица 12). В качестве отрицательного контроля использовали плазмиду pBI121. В результате было отобрано 25 клонов, содержащих вставку целевой последовательности в векторе pBI121. Сиквенс плазмидной ДНК 4-х клонов с использованием праймеров 5727 и M2_rev (таблица 12), показал точное клонирование последовательности M143 во всех проанализированных векторах. Для последующей работы была использована одна из этих плазмид, обозначенная как pBIM2 (рисунок 9 А, Б). Полученная таким образом конструкция была использована для трансформации клеток *Agrobacterium tumefaciens* штамма CBE21.

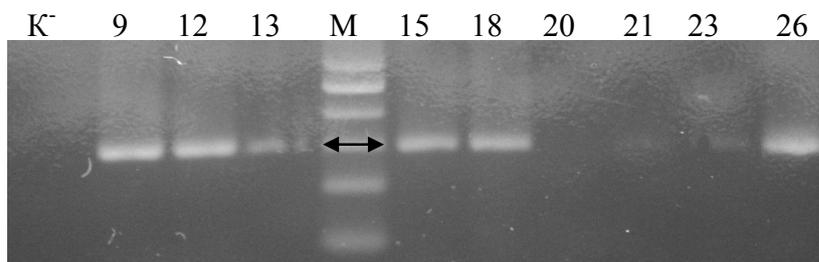
3.4 Трансформация растений табака *Nicotiana tabacum* вектором pBIM2, анализ трансгенных растений

Получение трансгенных растений ряски процесс длительный, поэтому предварительные исследования экспрессии синтетических последовательностей в растениях проводились с использованием табака *Nicotiana tabacum* L. сорта *Petite Havana SR1*. Трансформация растений табака осуществлялась по методу, разработанному Horsch с соавторами (Horsch et al., 1985). Для агробактериальной трансформации было использовано 20 листовых эксплантов табака возрастом не старше 3-х недель. Через 2 недели после начала культивации листовых эксплантов в темноте на селективной среде, содержащей 50 мг/л канамицина, происходило образование каллуса. После переноса эксплантов на свет, через 2-2,5 недели, наблюдалось образование первых регенерантов. Регенеранты пересаживались на селективную среду с ВАР и канамицином (70 мг/л) для индукции побегообразования и дальнейшей селекции. После того, как побеги достигали размера 2-3 см, их пересаживали в отдельные сосуды для дальнейшего размножения (рисунок 10, А). Таким образом, было получено 35 отдельных линий канамицинустойчивых регенерантов. Через две недели после пересадки на селективную среду без фитогормонов, содержащую канамицин (100 мг/л), у растений 26 линий наблюдалось образование корней. В последующем укоренившиеся растения были проанализированы на наличие агробактериальной инфекции методом ПЦР-анализа тотальной ДНК, с использованием праймеров VirC1 и VirC2, специфических к гену *virC*, характерному для *A. tumefaciens* (таблица 12).



**TCTAGAATGTCCCTCCTCACTGAAGTCGAAACTCCTACTAGAAATGAATGGGAGTGCA
GATGCTCTGATTCCAGCGACCCCTTGGTGGTGGCGGCGTCCATCATCGGCATCCTGC
ATCTCATCCTCTGGATCCTCCCCGGG**

А



Б

Рисунок 9 А - Схема полученного вектора pBIM2 и нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента M143. Подчеркнуты сайты рестрикции *Xba*I и *Sac*I

Б - Результат ПЦР – анализа некоторых клонов *E.coli* DH5 α , содержащих последовательность M143 в векторе pBIM2 с использованием пары праймеров 5727 и M2_rev.

Цифрами обозначены различные клоны *E.coli* DH5 α pBIM2. K⁻ вектор pBIM2, M- ДНК маркеры «Fermentas» серии “Low Range” (Литва), стрелкой указан маркер 150 н.п. Ожидаемая длина фрагмента 149 н.п.

В результате было показано отсутствие агробактериальной контаминации в 20-ти линиях. Далее, ДНК отобранных растений анализировали на наличие вставки последовательности M143 методом ПЦР, с использованием пары праймеров M2_for/M2_rev (таблица 12). В качестве контроля использовали ДНК, выделенную из листьев табака, трансформированных вектором pVI121 и нетрансформированных растений. В результате было показано наличие вставки фрагмента M143 в 15 из 20 линий полученных трансформантов (рисунок 10 Б, В).

Растения, в ДНК которых детектировалось присутствие целевого фрагмента, переносились из стерильных условий в теплицу. В последующих анализах использовались трансгенные растения, культивируемые в теплице два месяца. Из листьев табака трех линий была выделена тотальная РНК, необходимая для ОТ-ПЦР анализа. Для получения кДНК, препараты РНК были обработаны ферментом обратной транскриптазы M-MuLV RT («Fermentas») с праймером oligo(dT)₁₂₋₁₈ в качестве затравки в условиях, рекомендованных фирмой производителем. Далее образцы кДНК амплифицировали с праймерами M2_for/M2_rev (таблица 12) с целью обнаружения соответствующего транскрипта в составе мРНК табака. В качестве отрицательного контроля при ОТ-ПЦР анализе использовали тотальную РНК, выделенную из растений табака, трансформированного вектором pVI121. В результате было показано наличие в кДНК фрагментов ожидаемого размера в 129 н.п. в трех изученных линиях трансгенных растений (рисунок 10, Г), что указывало на успешную транскрипцию синтетического гена M143. Однако, проведенный в последующем вестерн - блот анализ препаратов тотального белка трансгенных растений табака с использованием антител к пептиду M2е вируса гриппа, не выявил наличия целевого продукта.

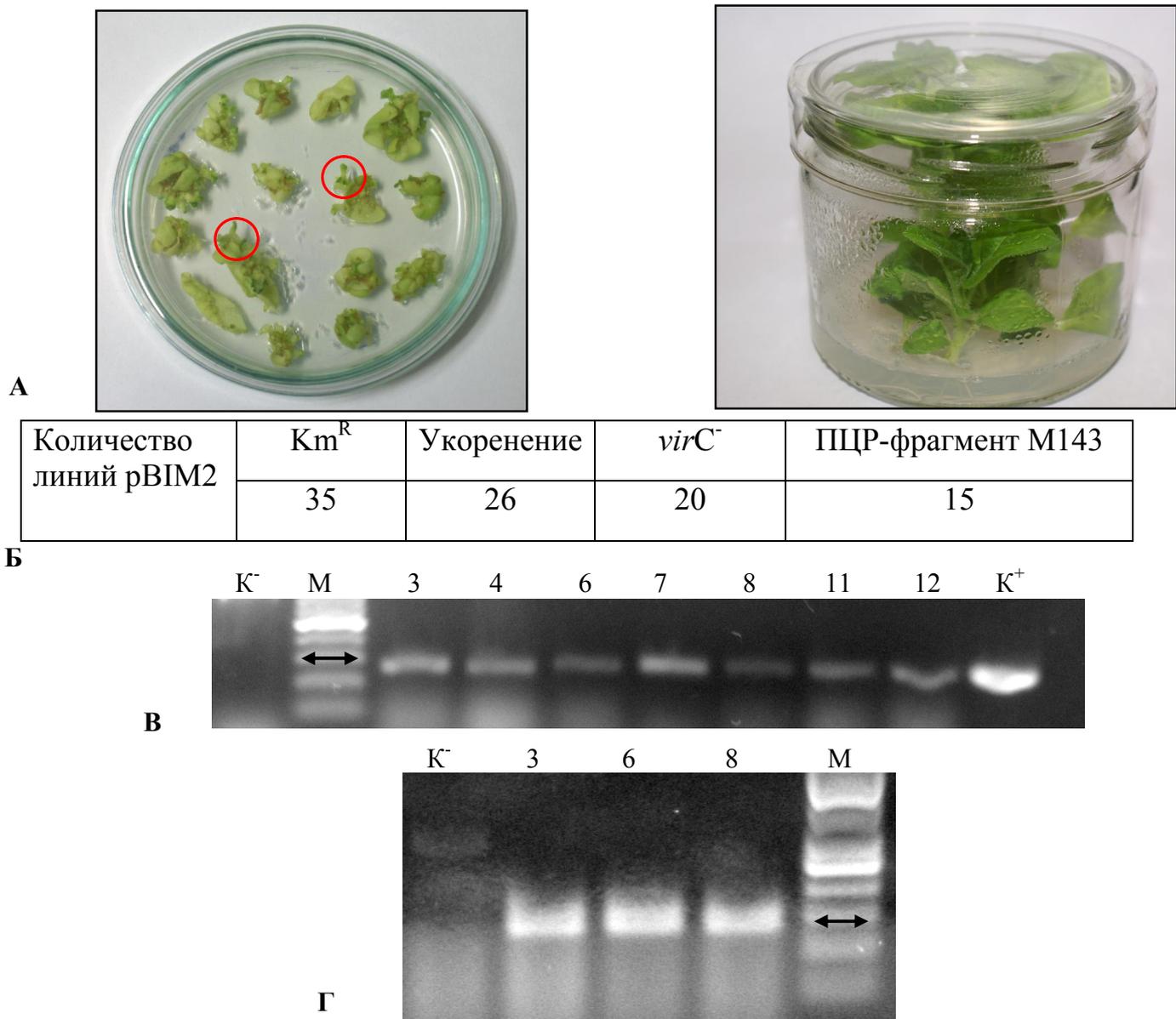


Рисунок 10 - Получение и анализ растений табака, трансформированных вектором рВІМ2

А – Образование регенерантов на листовых эксплантах табака на селективной гормональной среде с канамицином (50 мг/л) и укоренившиеся канамициностойчивые растения табака *in vitro*; **Б** - таблица эффективности трансформации растений табака вектором рВІМ2: Km^R - устойчивые к канамицину линии, virC⁻ - линии, не содержащие агробактерий; **В** - Результат ПЦР-анализа некоторых канамициностойчивых линий табака с использованием праймеров M2_for/M2_rev. **Г** - Результат ОТ-ПЦР анализа некоторых линий трансгенных растений табака с использованием праймеров к целевому фрагменту М143 M2_for/M2_rev. Цифрами обозначены линии трансгенных растений; K⁺ - вектор рВІМ2; K⁻ - табак, трансформированный вектором рВІ121; М- ДНК маркеры «Fermentas» серии “Low Range” (Литва), стрелкой указан маркер 150 н.п. Ожидаемая длина фрагмента 129 н.п.

Полученные результаты соотносятся с литературными данными показывающими, что экспрессия коротких пептидов (в 15-20 аминокислотных остатков) в трансгенных растениях представляет определённую проблему (Giddings et al., 2000). Это связано с тем, что короткие аминокислотные последовательности в растительных клетках нестабильны, быстро деградируют и редко накапливаются в заметных количествах, а эндогенные растительные пептиды синтезируются в виде длинных предшественников, которые затем подвергаются процессингу с образованием зрелых, биологически активных пептидов (Twyman et al., 2003; He et al., 2008).

Таким образом, нами была показана транскрипция экспрессионной кассеты, содержащей синтетический ген M143 в трансгенных растениях табака.

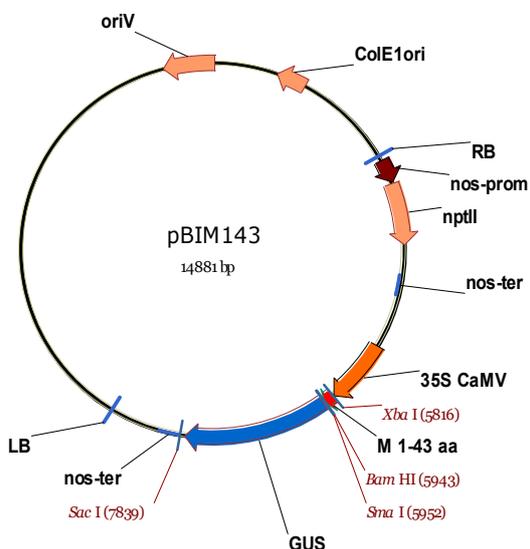
3.5 Клонирование гена M143 в трансляционном слиянии с геном β -глюкуронидазы. Анализ экспрессии слитой последовательности M143 - β -глюкуронидаза в трансгенных растениях табака

Одним из методов повышения уровня синтеза пептидов в трансгенных растениях является их экспрессия в трансляционном слиянии с каким-либо белком-носителем. К числу таких белков относятся β -глюкуронидаза-гидролаза, катализирующая расщепление многочисленных β -глюкуронидов. Ген β -глюкуронидазы (GUS) клонирован и широко используется в генетической инженерии растений. Он кодирует фермент, отличающийся высокой стабильностью и способностью накапливаться в больших количествах в растительных клетках. β -глюкуронидаза не оказывает токсического эффекта на растения и может быть легко детектирована различными методами, что существенно для детекции целевого продукта в растениях (Jefferson et al., 1987; Wigdorovitz et al., 2004).

Клонирование синтетического фрагмента M143 в трансляционном слиянии с 5'-концом гена β -глюкуронидазы (GUS) проводили как описано в главе «Материалы и методы». Нуклеотидная последовательность гена M143 была амплифицирована с использованием пары праймеров M2-143for/ M2-143rev

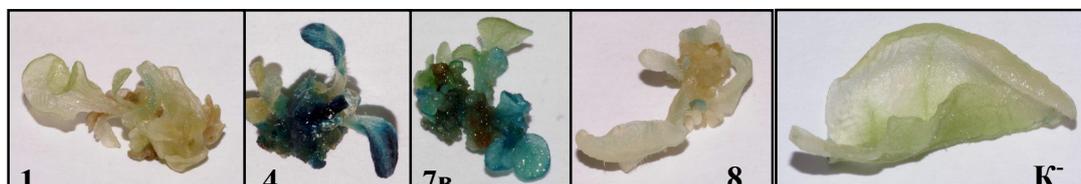
(таблица 12) и вектора pUC19M143 в качестве матрицы. Полученный фрагмент и вектор pBI121 последовательно гидролизовали рестриктазами *Xba*I и *Bam*HI и лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы, в условиях, рекомендованных производителями ферментов. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5 α , трансформанты высевали на селективную среду LB. Отбор трансформантов проводили при помощи ПЦР - анализа выросших колоний с использованием пары праймеров M2-143for/ uidA_low (таблица 12), позволяющих амплифицировать фрагмент ДНК, содержащий последовательность M143 и 5'-концевой участок β -глюкуронидазы. В качестве отрицательного контроля использовали плазмиду pBI121. В результате было отобрано 15 клонов, содержащих вставку целевой последовательности в трансляционном слиянии с геном GUS в векторе pBI121. Сиквенс плазмидной ДНК 4-х клонов с использованием праймеров 5727 и uidA_low (таблица 12), показал точное клонирование слитой последовательности M143- GUS в анализируемых плаزمидах. Для последующей работы была использована одна из этих плазмид, обозначенная как pBIM143 (рисунок 11 А). Полученная таким образом конструкция была использована для трансформации клеток *Agrobacterium tumefaciens* штамма CBE21.

Трансформация растений табака и отбор трансгенных растений проводились по методике, описанной в п.3.4. В результате было получено 25 независимых канамицинустойчивых линий регенерантов, у 15-ти из которых наблюдалось образование корней через две недели после пересадки на селективную среду без фитогормонов. Полученные *in vitro* растения табака этих линий были проанализированы методом гистохимического окрашивания, как описано в п.2.15. Анализ активности β -глюкуронидазы показал различную степень окраски отдельных линий растений, трансформированных вектором pBIM143, варьирующую от интенсивной до очень слабой (рисунок 11,Б).

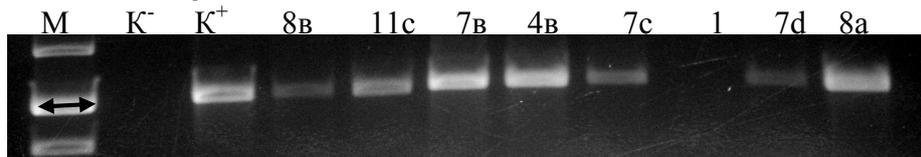


**TCTAGAATGTCCCTCCTCACTGAAGTCGAAACTCCTACTAGAAATGAATGGG
AGTGCAGATGCTCATTCCAGCGACCCCTTGGTGGTGGCGGGCGTCCATCATCG
GCATCCTGCATCTCATCCTCTGGATCCTCCCAGGGGGTCAGTCCCTTATGTTACG**

А



Б



В

| Количество линий pBIM143 | Km ^R | Укоренение | GUS ⁺ <i>in vitro</i> | <i>virC</i> ⁻ | ПЦР-фрагмент M143 |
|--------------------------------|-----------------|------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------|
| | 25 | 15 | 12 | 12 | 11 |

Г

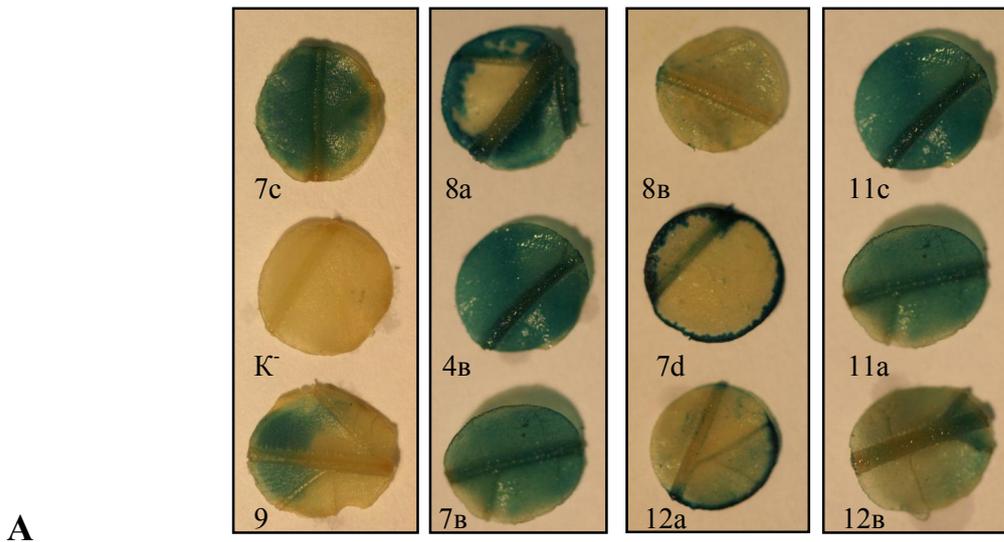
Рисунок 11 - Схема полученного вектора и результат анализа растений табака, трансформированных вектором pBIM143.

А - Схема вектора pBIM143 и нуклеотидная последовательность M143 клонированная в слиянии с геном β-глюкуронидазы (GUS). Фрагмент гена β-глюкуронидазы выделен курсивом, подчеркнуты сайты рестрикции *Xba*I и *Bam*HI. **Б -** Результат гистохимического анализа канамицинустойчивых регенерантов некоторых линий. Цифрами обозначены различные линии табака; K⁻ - нетрансгенное растение. **В -** Результат ПЦР-анализа тотальной ДНК некоторых канамицинустойчивых линий табака с использованием праймеров M2-143for/uidA_low. Цифрами обозначены различные линии канамицинустойчивых растений табака; K⁻ - нетрансформированное растение, K⁺ - плаزمида pBIM143, M- ДНК маркеры «СибЭнзим» серии M12, стрелкой указан маркер 1000 н.п. Ожидаемая длина фрагмента- 1024 н.п. **Г-** таблица эффективности трансформации растений табака вектором pBIM143: Km^R - устойчивые к канамицину линии, GUS⁺ - положительное окрашивание X-GLUC, *virC*⁻ - линии, не содержащие агробактерий.

Исходя из предположения, что степень окрашивания соответствует уровню экспрессии β -глюкуронидазы, для дальнейшего культивирования было отобрано 12-ть линий канамицинустойчивых растений табака, продемонстрировавших наибольшую интенсивность окрашивания. Тотальная ДНК отобранных растений была проанализирована на наличие агробактериальной инфекции методом ПЦР, с использованием праймеров VirC1 и VirC2, специфических к гену *virC*, характерному для *A. tumefaciens* (таблица 12). В результате было показано отсутствие агробактериальной контаминации во всех этих линиях. Для доказательства трансгенной природы полученных канамицинустойчивых линий табака был проведен ПЦР-анализ тотальной растительной ДНК с праймерами M2-143for/uidAlow (таблица 12). В качестве положительного контроля была использована плазида pVIM143, отрицательного- ДНК нетрансформированных растений табака. В итоге амплификация специфического фрагмента размером 1024 н.п. была показана в 11-ти линиях из 12-ти проанализированных (рисунок 11 В, Г).

Все линии трансгенных растений табака, содержащие слитую последовательность M143- GUS были переданы в теплицу для адаптации и дальнейшего роста. Культивирование трансгенных растений в теплице в течение одного года показало, что по скорости роста, времени цветения и фенотипическим характеристикам (толщина стебля, габитус и т.д.) трансгенные растения не отличаются от контрольных, нетрансгенных, растений.

Через 3 недели после адаптации в теплице высечки из листовых пластинок трансгенных растений были проанализированы на наличие активности β -глюкуронидазы. Степень окрашивания отдельных трансгенных растений варьировала от интенсивной до очень слабой, но была заметно ниже, чем при гистохимическом анализе тех же растений *in vitro* (рисунок 12 А, Б).



А

| № линии | 4в | 7в | 7с | 7d | 8а | 8в | 9 | 11а | 11с | 12а | 12в |
|-----------------|-----|-----|----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>in vitro</i> | +++ | +++ | ++ | + | ++ | + | + | + | +++ | + | + |
| 3 нед. | ++ | ++ | + | +/- | + | - | +/- | + | ++ | +/- | +/- |
| 6 мес. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Б

11а 4в К⁺ К⁻ 11с 7с М 8а 9 К⁺



В

Рисунок 12 - Результат анализа экспрессии β -глюкуронидазы в трансгенных растениях табака, содержащих слитую последовательность M143- GUS

А - Результат гистохимического окрашивания листовых пластинок трансгенных растений табака через 3 недели роста в теплице. Цифрами обозначены различные линии; К⁻ - нетрансгенное растение табака.

Б - Таблица результатов гистохимического окрашивания трансгенных растений табака разного возраста (*in vitro*, 3 недели и 6 месяцев роста в теплице). Знаком + обозначена интенсивность окрашивания растительных тканей, - отсутствие окраски и +/- частичное окрашивание ткани.

В - Результат вестерн-блот анализа некоторых линий трансгенных растений табака с использованием антител к β -глюкуронидазе. Детекцию сигнала проводили на рентгеновской плёнке РМ-1 с помощью люминесцентного субстрата ECL. Цифрами обозначены линии трансгенных растений; К⁻ - нетрансгенное растение табака; К⁺ - растения табака, трансформированные вектором pBI121; М - маркер молекулярной массы «Fermentas», стрелкой обозначен маркер 85 кДа. Ожидаемый размер слитого белка M143- GUS 75,5 кДа.

Через 6 месяцев культивирования в теплице трансгенные растения табака были еще раз окрашены с использованием субстрата для β -глюкуронидазы X-GLUC («Fermentas»). В результате этого анализа было показано отсутствие экспрессии β -глюкуронидазы в растениях, трансформированных вектором pVIM143 (рисунок 12,Б). Вестерн-блот анализ препаратов тотального белка, выделенного из листьев трансгенных растений, с использованием антител против β -глюкуронидазы, подтвердил отсутствие этого протеина во всех изученных линиях (рисунок 12, В).

Мы предполагаем, что на характер синтеза слитого белка в трансгенных растениях табака могло повлиять наличие внутримембранного гидрофобного домена белка M2 (25 -43 а. о.) в пептиде M143. Возможно, функции этого домена критичны для жизнедеятельности растительной клетки, что вызывает постепенное выключение экспрессии слитой последовательности M143- GUS - белок либо не образуется, либо его количество настолько мало, что не детектируется. Другим возможным объяснением может послужить то, что трансмембранный домен белка M2, даже в виде синтетического пептида, может собираться в тетрамерную структуру (Salom et al., 2000; Ma et al., 2009). Возможно, что присутствие этого домена ведёт к некорректной сборке мономеров слитого белка M143- β -глюкуронидаза в тетрамерную структуру, характерную для β -глюкуронидазы (Blanco et al., 1987). Образующиеся при этом агрегаты могут рассматриваться системой протеолиза растительной клетки как дефектные. Кроме того, показано, что экспрессия полноразмерного M2 в дрожжах может вести к формированию функционирующих ионных каналов с выраженным ингибированием роста дрожжей (Kurtz et al., 1995). Возможно, что присутствие полноразмерного трансмембранного домена в белке M143- β -глюкуронидаза ведёт к его интеграции в мембраны растительной клетки с последующим узнаванием защитными механизмами клетки этого процесса как неправильного. В любом случае, слитый белок M143- β -глюкуронидаза узнаётся клеткой как дефектный/чужеродный, что запускает механизмы его деградации.

Таким образом, было показано, что после 6 месяцев культивирования в теплице растений табака, трансформированных вектором pVIM143, происходило «выключение» синтеза в растительных клетках слитого белка M143-β-глюкуронидаза.

3.6 Клонирование последовательностей M130 и M122 в трансляционном слиянии с геном β-глюкуронидазы. Анализ экспрессии слитых генов в трансгенных растения табака

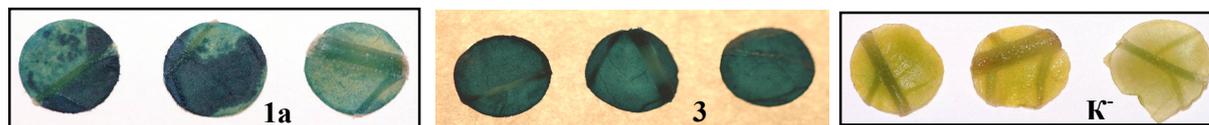
Исходя из полученных результатов экспрессии слитой последовательности M143-GUS в трансгенных растениях табака, были клонированы укороченные варианты последовательности M143, кодирующие пептиды с частично или полностью удаленным трансмембранным доменом. Нуклеотидные последовательности укороченных вариантов аминокислотного фрагмента белка M2, длиной 30 а.о. (M130) и 22 а.о. (M122) были амплифицированы с использованием вектора pVIM143 в качестве матрицы и пары праймеров M2-130for/M2-130rev и M2-130for/M122R (таблица 12), соответственно. Полученные последовательности, M130 и M122, были клонированы в векторе pVI121 в трансляционном слиянии с 5'-концом гена β-глюкуронидазы, как описано в п.3.5. Отбор трансформантов проводили с помощью ПЦР - анализа выросших колоний с использованием пары праймеров M2-130for/ uidA_low (таблица 12), позволяющих амплифицировать участок ДНК, содержащий последовательности M130 или M122 в слиянии с фрагментом гена β-глюкуронидазы. В результате, было отобрано 18 клонов, содержащих вставку последовательности M130 и 20 клонов со вставкой последовательности M122 в трансляционном слиянии с геном GUS в векторе pVI121. Сиквенирование плазмидной ДНК 6-ти клонов с использованием праймеров 5727 и uidA_low (таблица 12), показало точное клонирование слитых последовательностей M130-GUS и M122-GUS в анализируемых плаزمидях. Полученные векторы, обозначенные как pVIM130 и pVIM122, были использованы для трансформации клеток *Agrobacterium tumefaciens* штамма CBE21 и последующей агробактериальной трансформации растений табака.

| Количество линий | Km ^R | Укоренение | GUS ⁺ <i>in vitro</i> | <i>virC</i> ⁻ | Целевой ПЦР-фрагмент |
|------------------|-----------------|------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------|
| pBIM130 | 22 | 21 | 15 | 12 | 12 |
| pBIM122 | 24 | 22 | 15 | 10 | 10 |

А

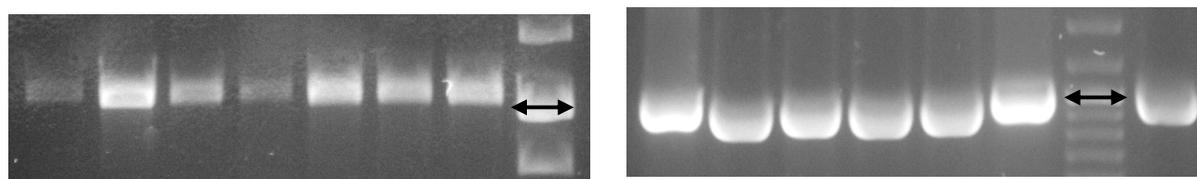


Б



2 16 17b 18 19 21a 21b M 1 1a 3 3c 4a 10b M K⁺

В



Г

| № линии | 2 | 16 | 17b | 19 | 21a | 1 | 1a | 3 | 3c | 4a | 10b |
|-----------------|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|
| <i>in vitro</i> | +++ | +++ | +++ | + | ++ | +++ | +++ | +++ | + | + | ++ |
| 3 нед. | +++ | +++ | +++ | + | + | +++ | +++ | +++ | + | + | + |
| 6 мес. | +++ | ++ | +++ | + | + | ++ | +++ | +++ | + | + | + |

Рисунок 13 - Результаты анализа растений табака, трансформированных векторами pBIM130 и pBIM122

А - таблица эффективности трансформации растений табака векторами pBIM130 и pBIM122: Km^R - устойчивые к канамицину линии, GUS⁺ - положительное окрашивание X-GLUC, *virC*⁻ - линии, не содержащие агробактерий. **Б** - результат гистохимического окрашивания некоторых линий трансгенных растений табака после 6 месяцев культивирования в теплице. Цифрами обозначены различные линии трансгенных растений (см. рис. Б); K⁻ - нетрансгенное растение табака. **В** - результат ПЦР-анализа тотальной ДНК некоторых канамицинустойчивых линий табака с использованием праймеров M2-130for/uidA_low. Обозначения: 2, 16, 17b, 19 и 21a- линии растений табака, трансформированные вектором pBIM130; 1, 1a, 3, 3c, 4a и 10b- линии растений табака, трансформированные вектором pBIM122; K⁻- вектор pBIM122; M- ДНК маркеры «СибЭнзим» серии M12, стрелкой указан маркер 1000 н.п. Ожидаемая длина фрагментов-1000 н.п. (M130) и 976 н.п. (M122). **Г**- таблица результатов гистохимического окрашивания трансгенных растений табака разного возраста (*in vitro*, 3 недели и 6 месяцев роста в теплице). Линии трансгенных растений обозначены как на рис. В, знаками + обозначена интенсивность окрашивания растительных тканей.

Трансформацию растений табака *Nicotiana tabacum L.* сорта *Petite Havana SR1* векторами pВІМ130 и pВІМ122 и отбор трансгенных растений проводили по методике, описанной в п.3.4. В результате было получено 22 независимые канамицинустойчивые линии растений табака, трансформированных вектором pВІМ130 и 24 линии, трансформированных вектором pВІМ122. Полученные *in vitro* растения табака были проанализированы методом гистохимического окрашивания, как описано в п.2.15. Анализ активности β -глюкуронидазы показал различную степень окраски отдельных линий растений, от интенсивной до очень слабой, так же как и для растений, трансформированных вектором pВІМ143 (рисунок 13 А, Г). Для дальнейших исследований было отобрано по 15-ть линий канамицинустойчивых растений табака, трансформированных векторами pВІМ130 и pВІМ122, степень окрашивания которых субстратом X-GLUC была наибольшей. Тотальная ДНК отобранных растений была проанализирована на наличие агробактерий методом ПЦР, с использованием праймеров VirC1 и VirC2 (таблица 12). В результате было показано отсутствие контаминации в 10 линиях растений, трансформированных вектором pВІМ122 и 12-ти линиях, трансформированных вектором pВІМ130. Для доказательства трансгенной природы этих линий табака был проведен ПЦР-анализ тотальной растительной ДНК с праймерами M2-130for/uidAlow (таблица 12). В итоге амплификация специфического фрагмента размером около 1000 н.п. была показана во всех изученных линиях растений (рисунок 13, А, В). Все линии трансгенных растений табака, содержащие слитую последовательность M130- GUS или M122-GUS были переданы в теплицу для дальнейшего роста.

После 6 месяцев культивирования в теплице трансгенные растения табака были еще раз проанализированы на активность β -глюкуронидазы с использованием субстрата X-GLUC («Fermentas»). В результате было показано, что экспрессия β -глюкуронидазы детектировалась во всех растениях, трансформированных векторами pВІМ130 и pВІМ122, причем интенсивность окрашивания листовых пластинок примерно соответствовала интенсивности окрашивания тканей *in vitro* (рисунок 13, Б, Г), Для дальнейших исследований было отобрано по 3 линии

растений, содержащих последовательности M130-GUS или M122-GUS, которые окрашивались наиболее быстро и интенсивно.

После получения результатов гистохимического окрашивания был проведен вестерн-блот анализ экспрессии слитых последовательностей в отобранных линиях трансгенных растений с использованием антител к β -глюкуронидазе и пептиду M2e, как описано в п.2.16 главы «Материалы и методы». В результате анализа общего белка, выделенного из листьев трансгенных растений табака с использованием антител к β -глюкуронидазе было показано присутствие в препаратах белковых полос молекулярной массой около 74кДа, что соответствовало ожидаемому размеру слитых белков M130- β -глюкуронидаза (74кДа) и M122- β -глюкуронидаза (73,1кДа). В качестве отрицательного контроля были использованы нетрансгенные растения табака, положительного - растения, трансформированные вектором pBI121. Как представлено на рисунках 14,А1 и 14,Б1, присутствие β -глюкуронидазы было показано в препаратах всех 6-ти изученных линий трансгенных растений табака - 2, 16, 17в (содержащих M130-GUS) и 1, 1а, 3 (M122-GUS). Детектируемые антителами полосы в препаратах трансгенных растениях табака мигрировали медленнее соответствующих полос в положительном контроле – белковых препаратов растений, трансформированных вектором pBI121 – что косвенно свидетельствовало о присутствии пептидов M130 и M122 в составе целевых белков. Вестерн-блот анализ белковых препаратов трансгенных растений табака с использованием антител к пептиду M2e подтвердил присутствие последовательностей M130 и M122 в составе слитых белков. При гибридизации с антителами к пептиду M2e, фрагменты белка M2 детектировались во всех 6-ти анализируемых линиях трансгенных растений (рисунок 14, А2, Б2). Масса узнаваемых антителами белков составляла около 74 кДа, что соответствовало последовательностям, детектируемым с помощью антител к β -глюкуронидазе. В препаратах белка из нетрансгенных растений, так же как и растений, экспрессирующих только β -глюкуронидазу, соответствующий сигнал отсутствовал. .

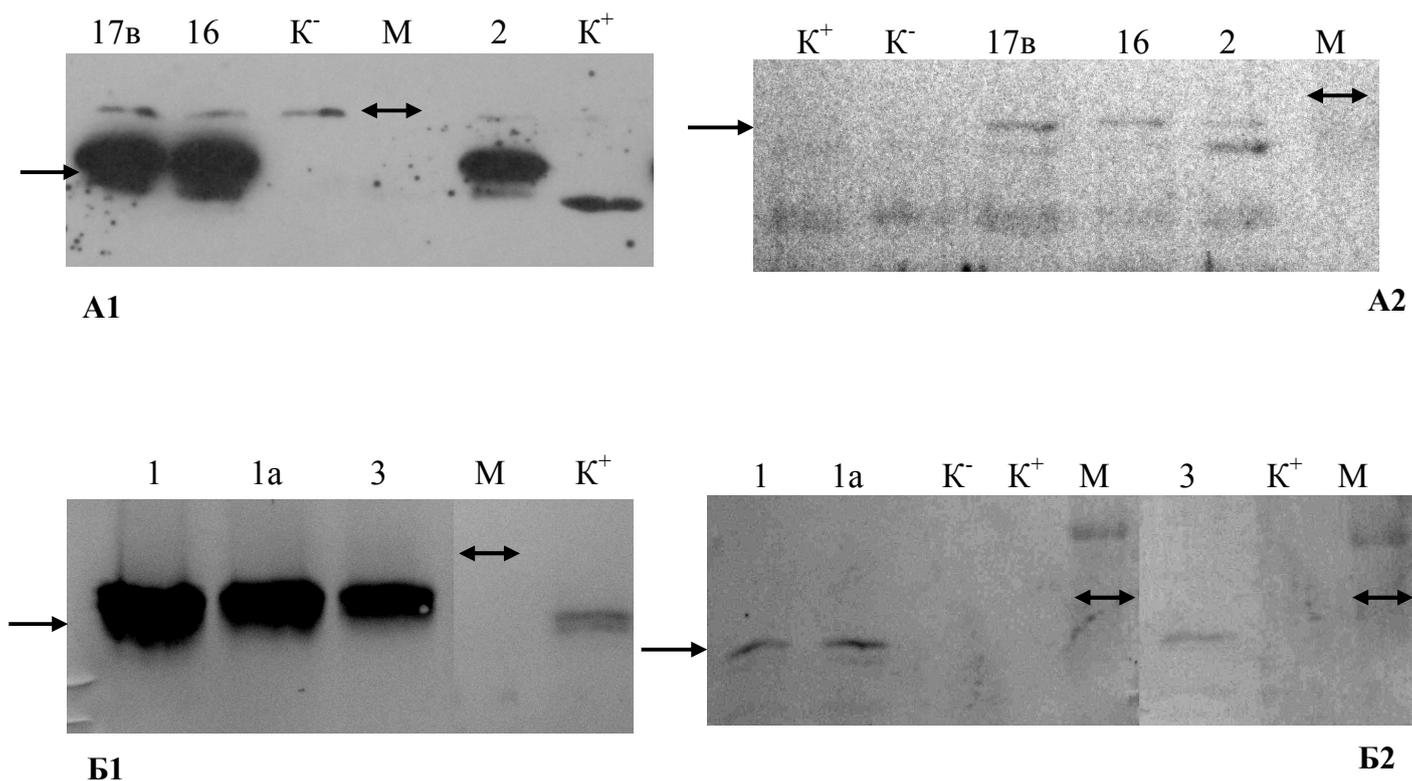


Рисунок 14 - Результат вестерн-блот анализа растений табака, трансформированных векторами pVIM130 (А) и pVIM122 (Б) с использованием антител к β -глюкуронидазе и пептиду M2e. Детекцию сигнала проводили на рентгеновской плёнке PM-1 с помощью люминесцентного субстрата ECL.

A1 - Антитела к β -глюкуронидазе, A2 - Антитела к пептиду M2e. Цифрами обозначены линии трансгенных растений, содержащих последовательность M130-GUS; K^- - нетрансформированное растение табака; K^+ - растения табака, трансформированные вектором pVI121; M- маркер молекулярной массы «Fermentas», двойной стрелкой обозначен маркер 85 кДа. Стрелкой указан слитый белок M130-GUS ожидаемого размера (74 кДа). **Б1.- Антитела к β -глюкуронидазе, Б2.- Антитела к пептиду M2e.** Цифрами обозначены линии трансгенных растений, содержащих последовательность M122- GUS; K^- - нетрансформированное растение табака; K^+ - растения табака, трансформированные вектором pVI121; M- маркер молекулярной массы «Fermentas», двойной стрелкой обозначен маркер 85 кДа. Стрелкой указан слитый белок M122-GUS ожидаемого размера (73,1 кДа).

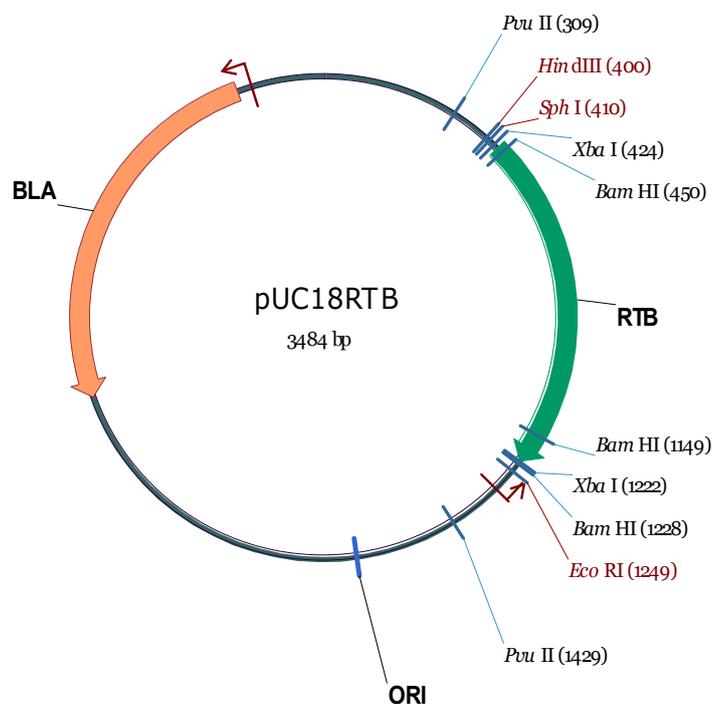
Таким образом, была подтверждена экспрессия фрагментов гена M2 вируса гриппа птиц в трансляционном слиянии с β -глюкуронидазой в трансгенных растениях табака. Было показано, что пептид M2e стабильно синтезировался в составе слитого белка в виде фрагментов длиной 30 а.о. (вариант M130) и 22 а.о. (вариант M122), включающего только последовательность M2e. Как следует из данных вестерн-блот анализа, эти варианты не различались заметно между собой по уровню экспрессии. Слитые белки M122- β -глюкуронидаза и M130- β -глюкуронидаза детектировались в виде одной полосы, что, учитывая концевое расположение аминокислотных последовательностей, узнаваемых использованными антителами, указывает на отсутствие заметной деградации целевых белков. По этим показателям растения содержащие последовательность M130 не отличались от растений, экспрессирующих вариант M122. В варианте M130 присутствовал фрагмент трансмембранного домена длиной 6 а.о. (PLVVAA), однако он не оказывал заметного влияния на уровень и стабильность экспрессии слитого белка M130- β -глюкуронидаза, в отличие от последовательности M143. Как уже было отмечено, синтез слитого белка M143- GUS наблюдался только в растениях *in vitro*, после культивирования в теплице экспрессия целевой последовательности затухала. Вероятно, это связано с тем, что фрагмент M143 содержит трансмембранный гидрофобный домен PLVVAASIIIGILHLILWIL белка M2. Этот домен характеризуется высокой гидрофобностью, и, по-видимому, его присутствие может вести к тому, что слитый белок M143- β -глюкуронидаза узнаётся системой протеолиза растительной клетки как дефектный. Несмотря на это растения, трансформированные векторами pBIM143, как и растения трансформированные векторами pBIM122 и pBIM130 по своим морфологическим и ростовым характеристикам не отличались от контрольных нетрансформированных растений.

Исходя из полученных данных, оптимальным вариантом для экспрессии в трансгенных растениях является аминотерминальный фрагмент гена M2, включающий только пептид M2e или пептид M2e и короткий фрагмент трансмембранного домена. При экспрессии фрагмента, включающего как пептид

M2e, так и полноразмерный трансмембранный домен белка M2 (вариант M143), в ходе роста и развития трансгенных растений наблюдается затухание экспрессии. В то же время, растения, содержащие последовательности M122- β -глюкуронидаза или M130- β -глюкуронидаза демонстрируют стабильную экспрессию и накопление целевого пептида. Таким образом, для дальнейших исследований был выбран вариант M130 (5'-фрагмент гена M2, кодирующий первые 30 N-концевых аминокислотных остатков).

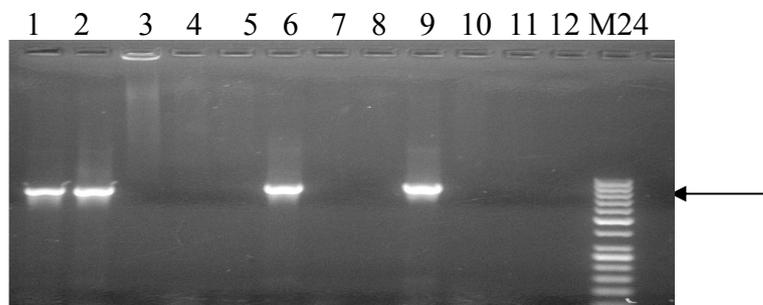
3.7 Клонирование гена субъединицы Б рицина *Ricinus communis* в векторе pUC18

Для усиления иммуногенных свойств антигенных детерминант субъединичных вакцин обычно используют молекулярные адьюванты. Мы остановили свой выбор на субъединице Б рицина - лектина из клещевины *Ricinus communis*. Субъединица Б рицина не токсична, в растительных клетках она выполняет транспортные и рецептофильные функции, связываясь со специфическими рецепторами клеточных мембран и вызывая структурную перестройку мембраны с образованием трансмембранного канала. Рядом авторов было показано, что по своим иммуногенным свойствам субъединица Б рицина не уступает такому известному адьюванту, как холерный токсин (Bolivara et al., 2002; Woffenden et al., 2008; Liu et al., 2013). Кроме того, было высказано предположение, о том, что растительное происхождение данного белка будет способствовать его экспрессии и накоплению в трансгенных растениях. Последовательность гена субъединицы Б рицина (RTB) была клонирована в векторе pUC18 как описано в главе «Материалы и методы». Амплификацию RTB проводили с использованием праймеров RTB_F и RTB_R (таблица 12), в качестве матрицы была использована тотальная ДНК, выделенная из листьев местного сорта клещевины (*Ricinus communis*). Полученная последовательность и вектор pUC18 были обработаны рестриктазами *XbaI* и *SacI* и лигированы с использованием ДНК-лигазы фага T4 в условиях, рекомендованных производителями ферментов.



ADVCMDPEPI VRIVGRNGLC VDVRDGRFHN GNAIQLWPCK NTDANQLWT
 LKRDNTIRSN GKCLTTYGYS PGVYVMIYDC NTAATDATRW IWDNGTIIN
 PRSSLVLAAT SGNSGTTLTV QTNIYAVSQ WLPTNNTQPF TTIVGLYGL
 CLQANSQVW IEDCSSEKAE QQWALYADGS IRPQQNRDNC TSDSNIRET
 VVKILSCGPA SSGQRWMFKN DGTILNLYSG LVL DVRASDP LKQIILYPL
 HGDPNQIWLP LF

А



Б

Рисунок 15 А - Схема полученного вектора pUC18RTB и аминокислотная последовательность клонированной субъединицы Б рицина

Б - Результат ПЦР – анализа клонирования последовательности RTB в векторе pUC18 с использованием праймеров RTB_F и RTB_R. Цифрами обозначены различные клоны *E.coli* DH5α pUC18RTB. M24- ДНК маркеры «СибЭнзим» (Россия), стрелкой указан маркер 800 н.п. Ожидаемая длина фрагмента 798 н.п

X03179 GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
X52908 GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
GQ916908 GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
AASG0205 GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
JQ617861 GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
GU073248 GTTGTATGCTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
contigRTB GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA

X03179 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
X52908 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
GQ916908 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
AASG0205 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
JQ617861 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
GU073248 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
contigRTB TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA

X03179 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAT
X52908 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAT
GQ916908 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAT
AASG0205 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAT
JQ617861 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAT
GU073248 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAT
contigRTB CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAT

X03179 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTAACACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
X52908 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTAACACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
GQ916908 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTAACACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
AASG0205 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTAACACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
JQ617861 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTAACACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
GU073248 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTAACACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
contigRTB CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTAACACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA

X03179 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGAATAGAGGACTGTAGCAGTGA
X52908 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGAATAGAGGACTGTAGCAGTGA
GQ916908 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGAATAGAGGACTGTAGCAGTGA
AASG0205 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGAATAGAGGACTGTAGCAGTGA
JQ617861 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGAATAGAGGACTGTAGCAGTGA
GU073248 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGATAGAGGACTGTAGCAGTGA
contigRTB CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGAATAGAGGACTGTAGCAGTGA

| | |
|-----------|--|
| X03179 | AAAGGCTGAACAACAAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAAACCGAGATAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA |
| X52908 | AAAGGCTGAACAACAAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAAACCGAGATAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA |
| GQ916908 | AAAGGCTGAACAACAAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAAACCGAGATAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA |
| AASG0205 | AAAGGCTGAACAACAAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAAACCGAGATAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA |
| JQ617861 | AAAGGCTGAACAACAAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAAACCGAGATAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA |
| GU073248 | AAAGGCTGAACAACAAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAAACCGAGATAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACAGGGAACA |
| contigRTB | AAAGGCTGAACAACAAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAAACCGAGATAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA |
| | |
| X03179 | GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGGTTGGTGTTAG |
| X52908 | GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGGTTGGTGTTAG |
| GQ916908 | GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGGTTGGTGTTAG |
| AASG0205 | GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGGTTGGTGTTAG |
| JQ617861 | GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGGTTGGTGTTAG |
| GU073248 | GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAATGGAATTGGTGTTAG |
| contigRTB | GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGGTTGGTGTTAG |
| | |
| X03179 | ATGTGAGGGCATCGGATCCG |
| X52908 | ATGTGAGGGCATCGGATCCG |
| GQ916908 | ATGTGAGG----- |
| AASG0205 | ATGTGAGGGCATCGGATCCG |
| JQ617861 | ATGTGAGGGCATCGGATCCG |
| GU073248 | ATGTGAGGGCATCGGATCCG |
| contigRTB | ATGTGAGGGCATCGGATCCG |

Рисунок 16 - Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности субъединицы Б рицина полученной в данной работе (contigRTB), с нуклеотидными последовательностями из базы данных GenBank

AASG0205- *Ricinus communis* cultivar Hale, Chan A. et al., 2006, 2007, 2008; GQ916908 - *Ricinus communis* preproricin gene, Weeks et al., 2010; GU073248- *Ricinus communis* ricin B chain gene, Mahrous et al., 2009; JQ617861- *Ricinus communis* cultivar RB816 ricin B-chain gene, Kiani et al., 2012; X03179- *Ricinus communis* gene for ricin precursor. Halling et al., 1985; X52908 - *Ricinus communis* ricin gene, Tregear et al., 1992.

Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5 α , трансформанты высевали на селективную среду LB, содержащую X-gal и IPTG. В результате сине-голубого теста было отобрано 12 белых колоний, которые были проанализированы методом ПЦР с использованием праймеров на последовательность субъединицы Б рицина (таблица 12). В итоге было отобрано четыре клон, содержащих плазмиду со вставкой полноразмерной нуклеотидной последовательности RTB (рисунок 15, Б), обозначенных как pUC18RTB. Последовательности ДНК целевого гена в 4-х клон были секвенированы с использованием праймеров RTB_F и RTB_R (таблица 12).

Сравнение клонированной последовательности субъединицы Б рицина с последовательностями RTB из базы данных GenBank (рисунки 16, 17) показало, что в полученных клон нуклеотидные и аминокислотные последовательности RTB полностью совпадали с последовательностями, представленными Чан с соавторами (Chan et al., 2006, 2007, 2008), Виикс с соавторами (Weeks et al., 2010), Киани с соавторами (Kiani et al., 2012), Халинга с соавторами (Halling et al., 1985) и Трегера с соавторами (Tregear et al., 1992). Клонированная нами последовательность субъединицы Б рицина отличалась на 15 нуклеотидных остатков (10 аминокислотных замен) от последовательности, выделенной Махрусом с соавторами (Mahrous et al., 2009), что может быть связано с генетическими различиями использованных для исследований сортов клещевины *Ricinus communis*. В результате для дальнейшей работы был отобран один из четырех клонов, обозначенный как pUC18RTB.

3.8 Клонирование последовательности M130 в растительном экспрессионном векторе pVI121 в трансляционном слиянии с 5'-концом гена хитинсвязывающего домена (CBD) и 3'-концом последовательности субъединицы Б рицина

Следующей задачей нашей работы стало получение генетической конструкции, содержащей элементы, позволяющие в случае необходимости оптимизировать количество антигена M2e в экстрактах трансгенных растений. Для

этого к 3'-концу гена M130 был добавлен фрагмент, кодирующий хитинсвязывающий домен из хитиназы A1 *Bacillus circulans*, что позволит использовать хитинсодержащие носители для очистки целевого белка из растительного экстракта. Клонирование хитинсвязывающего домена (CBD) проводили в векторе pVIM130 как описано в главе «Материалы и методы». Нуклеотидная последовательность гена β -глюкуронидазы была удалена с помощью гидролиза по сайтам *Bam*HI и *Sac*I и последующей очистки гидролизованного вектора методом элюирования ДНК из агарозного геля. Амплификацию хитинсвязывающего домена (CBD) проводили с использованием пары праймеров CBD_for/CBD_rev (таблица 12) и вектора pTYB11 в качестве матрицы. Полученный фрагмент был последовательно обработан рестриктазами *Bam*HI и *Sac*I и лигирован с гидролизованным вектором pVIM130 с использованием ДНК-лигазы фага T4, в условиях, рекомендованных производителями ферментов. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5 α , которые далее высевали на селективную среду LB, содержащую 25 мкг/мл канамицина. Выросшие колонии анализировали методом ПЦР с использованием пары праймеров 5727/CBD_rev, позволяющих амплифицировать фрагмент, содержащий последовательности M130 и хитинсвязывающего домена.

В результате было отобрано восемь клонов, содержащих вектор pVI121 со вставкой слитой последовательности M130-CBD (рисунок 18). Сиквенирование полученных плазмид с использованием праймера 5727 показало полное совпадение вставки M130-CBD заданной в 3-х клонах. Для дальнейшей работы был выбран один из этих клонов, обозначенный как pVIM130CBD.

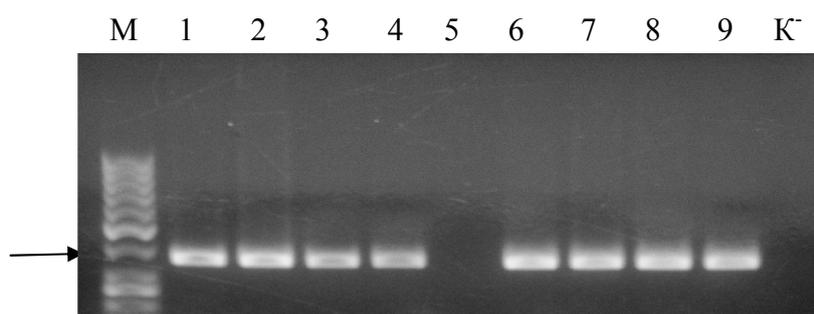


Рисунок 18 - Результат ПЦР – анализа слитой последовательности M130-CBD, клонированной в векторе pBI121 с использованием пары праймеров 5727/CBD_rev.

Цифрами обозначены различные клоны *E.coli* DH5α pBI130CBD, K⁻ - вектор pBI121, M- ДНК- маркеры серии M24 «СибЭнзим» (Россия), стрелкой указан маркер 400 н.п. Ожидаемая длина фрагмента 354 н.п.

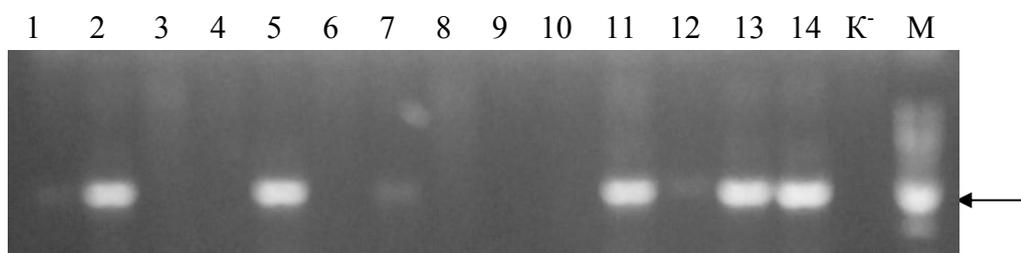


Рисунок 19 - Результат ПЦР анализа ориентации вставки RTB в векторе pBIRBinM130CBD с использованием пары праймеров 5727/RBin_R.

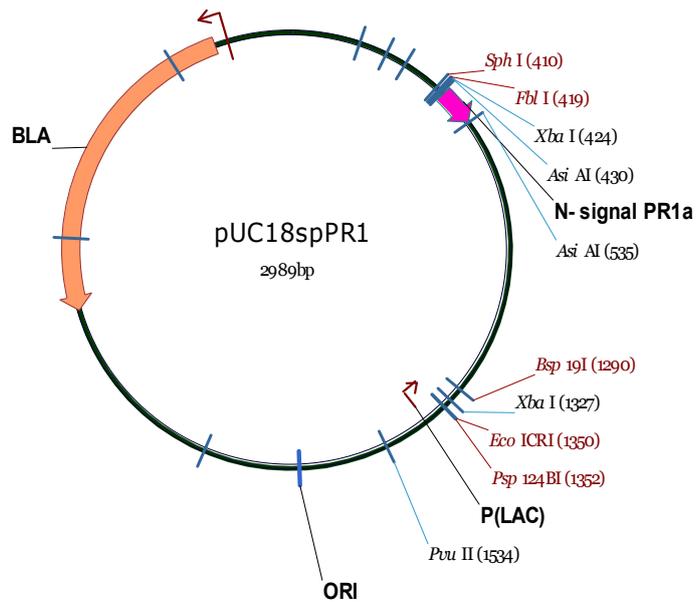
Цифрами обозначены различные клоны *E.coli* DH5α pBIRBinM130CBD; K⁻ - вектор pBI121, M- ДНК маркеры серии M12 «СибЭнзим» (Россия), стрелкой указан маркер 750 н.п. Ожидаемая длина фрагмента 884 н.п.

Нуклеотидная последовательность гена субъединицы Б рицина была клонирована в полученном векторе pBIM130CBD в трансляционном слиянии с 5'-концом последовательности M130. Последовательность RTB была амплифицирована с использованием праймеров RBin_F и RBin_R (таблица 12) и вектора pUC18RTB в качестве матрицы. В последовательность праймера RBin_F был дополнительно введен уникальный сайт рестрикции *AsiA*, в последующем использованный для клонирования гена сигнального пептида. Амплифицированный ген субъединицы Б рицина и вектор pBIM130CBD были гидролизованы рестриктазой *XbaI* («Fermentas», Литва) и лигированы с использованием ДНК-лигазы фага T4 в условиях, рекомендованных производителями ферментов. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5 α , трансформантов высевали на селективную среду LB, содержащую 25 мкг/мл канамицина. ПЦР анализ выросших клонов проводили с использованием пары праймеров 5727/RBin_R (таблица 12) для установления ориентации клонированной последовательности субъединицы Б рицина. В результате было показано присутствие вставки RTB в прямой ориентации в пяти клонах из четырнадцати (рисунок 19). Сиквенирование плазмидной ДНК отобранных клонов с использованием праймеров 5727 и M2-130rev, показало полное соответствие клонированных фрагментов исходным в одном клоне из пяти. Таким образом был получен экспрессионный вектор, содержащий слитую последовательность субъединицы Б рицина (RTB), 5'фрагмента гена M2 (M130) и хитинсвязывающего домена (CBD), обозначенный как pBIRBinM130CBD.

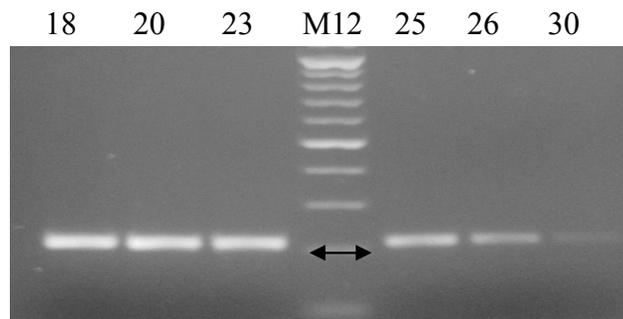
3.9 Клонирование сигнального пептида белка табака PR1a

Локализация белков в определенных компартментах клетки является одним из способов увеличения количества синтезируемого в растениях целевого продукта. Введение в полипептидную цепь целевого белка сигнальных последовательностей, определяющих его накопление в эндоплазматической сети или секрецию в апопласт, где интенсивность протеолиза значительно ниже, позволяет значительно повысить

продуктивность трансгенных растений (Giddings et al., 2000; Korban, 2002). В качестве сигнальной последовательности нами был выбран N-концевой сигнальный пептид белка PR1a табака (spPR1), определяющий транспорт белков в эндоплазматический ретикулум (Korban, 2002). Клонирование spPR1 было проведено в два этапа. На первом этапе 5'-концевой фрагмент гена PR1a был клонирован в векторе pUC18, как описано в главе «Материалы и методы». Амплификацию фрагмента проводили с использованием пары праймеров PR1_F/PR1_R (таблица 12). В качестве матрицы была использована тотальная ДНК, выделенная из листьев табака *Nicotiana tabacum L.* сорта *Petite Havana SR1*. Полученный фрагмент 5'-концевой последовательности PR1a и вектор pUC18 были гидролизованы по сайтам *SacI* и *BamHI* и лигированы с помощью ДНК-лигазы фага T4 в условиях, рекомендованных производителями ферментов. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5 α , трансформанты высевали на селективную среду LB, содержащую X-gal и ИПТГ. В результате сине-голубого теста было отобрано 15 белых колоний, которые были проанализированы методом ПЦР с использованием праймеров PR1_F/PR1_R (таблица 12). В итоге было отобрано шесть клонов, содержащих плазмиду со вставкой нуклеотидной последовательности 5'-концевого фрагмента гена PR1a (рисунок 20, А, Б). Последовательности ДНК в отобранных клонах были секвенированы с использованием праймеров PR1_F и PR1_R. В результате было показано, что только в одном клоне последовательность 5'-концевого фрагмента гена PR1a полностью совпадала с ожидаемой. Полученная плазида, обозначенная как pUC18PR1 была использована в дальнейшей работе.



ATGGGATTTGTTCTCTTTTCACAATTGCCTTCATTTCTTCTTGTCTCTACA
CTTCTCTTATTCCTAGTAATATCCCACTCTTGCCGTGCCCAAAATTC
 T



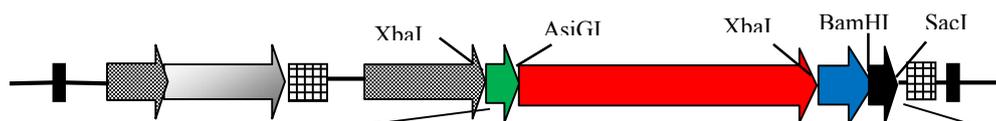
Б

Рисунок 20 - Клонирование 5'-концевого фрагмента гена PR1a табака в векторе pUC18

А- Схема полученного вектора pUC18spPR1 и нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента spPR1 (обозначен как N-signal PR1a). Подчеркнута последовательность сигнального пептида. **Б -** Результат ПЦР анализа последовательности spPR1 с использованием пары праймеров PR1_F/PR1_R. Цифрами обозначены номера полученных клонов *E.coli* DH5α pUC18spPR1, M12-ДНК маркеры «СибЭнзим», стрелкой отмечен маркер в 200 н.п. Ожидаемый размер фрагмента 210 н.п.

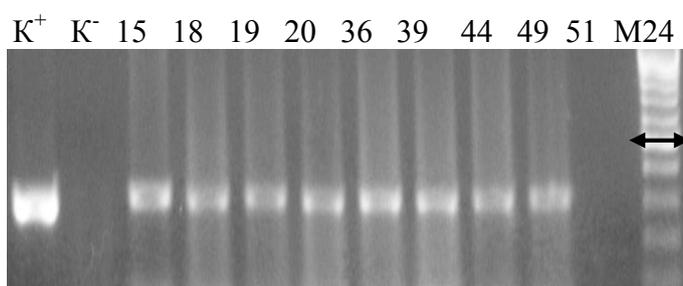
Следующим этапом работы стало клонирование последовательности сигнального пептида spPR1 в векторе pBIRBinM130CBD в трансляционном слиянии с 5'-концом нуклеотидной последовательности субъединицы Б рицина. Нуклеотидная последовательность сигнального пептида была амплифицирована с помощью пары праймеров RBsp_F/RBsp_R (таблица 12), содержащих дополнительно введенный сайт рестрикции *AsiAI*. В качестве матрицы при амплификации была использована плазмида pUC18PR1. Гидролиз вектора pBIRBinM130CBD и фрагмента spPR1 эндонуклеазой рестрикции *AsiAI*, и последующее лигирование гидролизатов проводили, как описано в главе «Материалы и методы». Полученной лигазной смесью были трансформированы компетентные клетки *E.coli* DH5 α , отбор трансформантов проводили на селективной среде LB, содержащей 25 мкг/мл канамицина. Выросшие колонии были проанализированы на наличие и ориентацию целевой последовательности spPR1 методом ПЦР с использованием пары праймеров 5727/RBsp_rev (рисунок 21, В). Параллельно клоны были проверены на присутствие слитой последовательности M130–CBD с помощью праймеров M2-130for/CBD_rev (рисунок 21, Б). В результате было отобрано четыре клон, содержащих слитую последовательность сигнального пептида PR1(sp)-субъединицы Б рицина (RTB)- 5'фрагмента гена M2 (M130) - хитинсвязывающего домена (CBD). В результате секвенирования полученных плазмид с использованием праймеров 5727 и CBD_rev были отобраны клоны, где последовательности целевых фрагментов полностью совпадали с ожидаемыми. Плазмида, обозначенная как pBIsprBM130, была использована для введения в клетки *A. tumefaciens* штамма CBE 21 и последующей агробактериальной трансформации растений табака и ряски.

RB nos prom NPT II nos ter 35S CaMV spPR1 RTB M130 CBD nos ter LB

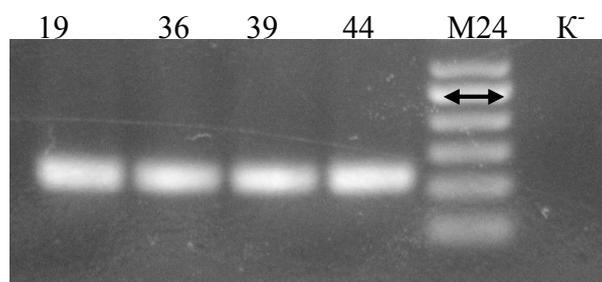


MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRAQNSTGADVCM DPEPIVRIVGRNG
 LCV D V R D G R F H N G N A I Q L W P C K S N T D A N Q L W T L K R D N T I R S N G K C L T T Y G
 Y S P G V Y V M I Y D C N T A A T D A T R W Q I W D N G T I I N P R S S L V L A A T S G N S G T T L T V
 Q T N I Y A V S Q G W L P T N N T Q P F V T T I V G L Y G L C L Q A N S G Q V W I E D C S S E K A E Q
 Q W A L Y A D G S I R P Q Q N R D N C L T S D S N I R E T V V K I L S C G P A S S G Q R M F K N D G T I
 L N L Y S G L V L D V R A S D P S L K Q I I L Y P L H G D P N Q I W L P L F S R M S L L T E V E T P T R N
 E W E C R C S D S S D P L V V A A G S T T N P G V S A W Q V N T A Y T A G Q L V T Y N G K T Y K C L
 Q P H T S L A G W E P S N V P A L W Q L Q

A



Б



В

Рисунок 21 - Клонирование сигнального пептида spPR1 в трансляционном слиянии с последовательностью RTB-M130-CBD.

А- Схема экспрессионной кассеты вектора pBIspRBM130 и аминокислотная последовательность слитого белка spPR1-RTB-M130-CBD. Цветом выделены фрагменты целевого белка: зеленым- сигнальный пептид PR1, красным- субъединица Б рицина, синим- фрагмент M130, черным- хитинсвязывающий домен.
Б - Результат ПЦР – анализа слитой последовательности M130-CBD в векторе pBIspRBM130 с использованием пары праймеров M2-130for/CBD_rev.

В - Результат ПЦР – анализа ориентации вставки spPR1 в векторе pBIspRBM130 с использованием пары праймеров 5727/RBsp_rev. Цифрами обозначены различные клоны E.coli DH5α pBIspRBM130, K⁻- вектор pBI121, K⁺- вектор pBIM130CBD, M24- ДНК-маркеры «СибЭнзим» (Россия), стрелкой отмечен маркер 500 н.п. Ожидаемый размер фрагментов- 354 н.п. для M130-CBD и 204 н. п. для 5727- spPR1.

3.10 Клонирование и экспрессия гена субъединицы Б рицина (RTB) в бактериальной системе

Для анализа экспрессии слитой последовательности RTB–M130 в трансгенных растениях и сравнения биологической активности RTB, синтезируемой в трансгенных растениях и полученной в бактериальной системе, последовательность RTB была клонирована в бактериальном экспрессионном векторе. Для наработки и выделения субъединицы Б рицина, мы использовали вектор pTYB11, определяющий C-терминальный вариант клонирования целевой последовательности по отношению к белку-носителю интеину в бактериальной системе синтеза рекомбинантных белков Protein Purification System Impact kit («New England BioLabs», Великобритания). Клонирование гена субъединицы Б рицина в векторе pTYB11 проводили, как описано в главе «Материалы и методы». Последовательность RTB была амплифицирована с использованием пары праймеров RBC_F/RBC_R и вектора pUC18RTB(2) в качестве матрицы. Полученный фрагмент и вектор pTYB11 были последовательно гидролизированы рестриктазами *PsiSI* (изошизомер *SapI*) («СибЭнзим», Россия) и *EcoRI* («Fermentas», Литва) и лигированы с помощью лигазы фага T4 («Fermentas», Литва) в условиях, рекомендованных производителями ферментов. Лигазная смесь вектора pTYB11 и ПЦР-фрагмента RTB была использована для трансформации *E. coli* штамма DH5 α , из полученных колоний методом ПЦР были отобраны пять клонов, содержащих плазмиду со вставкой последовательности RTB. Сиквенирование вставки в отобранных клонов проводили с использованием праймеров T7UnPr и RBC_R. В результате, для дальнейшей работы было отобрано четыре клон, далее обозначенные как pTYB11RBC, последовательности субъединицы Б рицина в которых полностью соответствовали ожидаемым. Схема полученного вектора представлена на рисунке 22, А.

Экспрессию RTB в бактериальных клетках проводили согласно рекомендации производителей Protein Purification System Impact kit («New England BioLabs», Великобритания). Плазмиды pTYB11RBC четырех клонов использовали для

трансформации штамма *E.coli* BL21(DE3). Индукцию экспрессии последовательности субъединицы Б рицина проводили при 28°C не позднее 2-х суток с момента получения трансформантов. Выросшие на селективной среде колонии высевали в жидкую среду LB, содержащую ампицилин, экспрессию слитого гена интеин- RTB индуцировали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ. Для первичного анализа накопления целевых белков, отбирали пробы бактериальных культур через 2, 4, и 20 часов после начала индукции. В качестве контроля использовали клетки BL21(DE3), не содержащие плазмиду и клетки, трансформированные вектором pTYB11. Анализ синтеза целевого белка в различных клонах проводили как описано в главе «Материалы и методы». Полученные результаты представлены на рисунке 22, Б.

Было показано накопление белка массой 84 кДа спустя 20 часов после начала индукции в клетках BL21(DE3) pTYB11RBC клонов 4, 10 и 12. Масса 84 кДа соответствует суммарной массе химерного белка интеин (56 кДа) – субъединица Б рицина (28 кДа), поэтому в последующем белки вышеуказанных клонов были проанализированы методом вестерн-блот с использованием антител к субъединице Б рицина и к хитинсвязывающему домену белка – носителя. В результате было показано, что антитела к хитинсвязывающему домену в клетках BL21(DE3) pTYB11RBC исследуемых клонов специфически связывались с белком размером 84 кДа, тогда как в контрольных препаратах клеток, трансформированных пустым вектором, размер детектируемого белка составлял 56 кДа, что соответствовало интеину (рисунок 23, А). Антитела к субъединице Б рицина в клетках BL21(DE3) pTYB11RBC клонов 4, 10 и 12 также специфически связывались с аминокислотной последовательностью размером 84 кДа, но не 56 кДа (рисунок 23, Б).

Таким образом, было показано, что максимальное накопление целевого белка в бактериальных клетках наблюдалось после 20-ти часов индукции в клоне BL21(DE3) pTYB11RBC 12, который и был отобран для дальнейшей работы (рисунки 22, Б и 23).

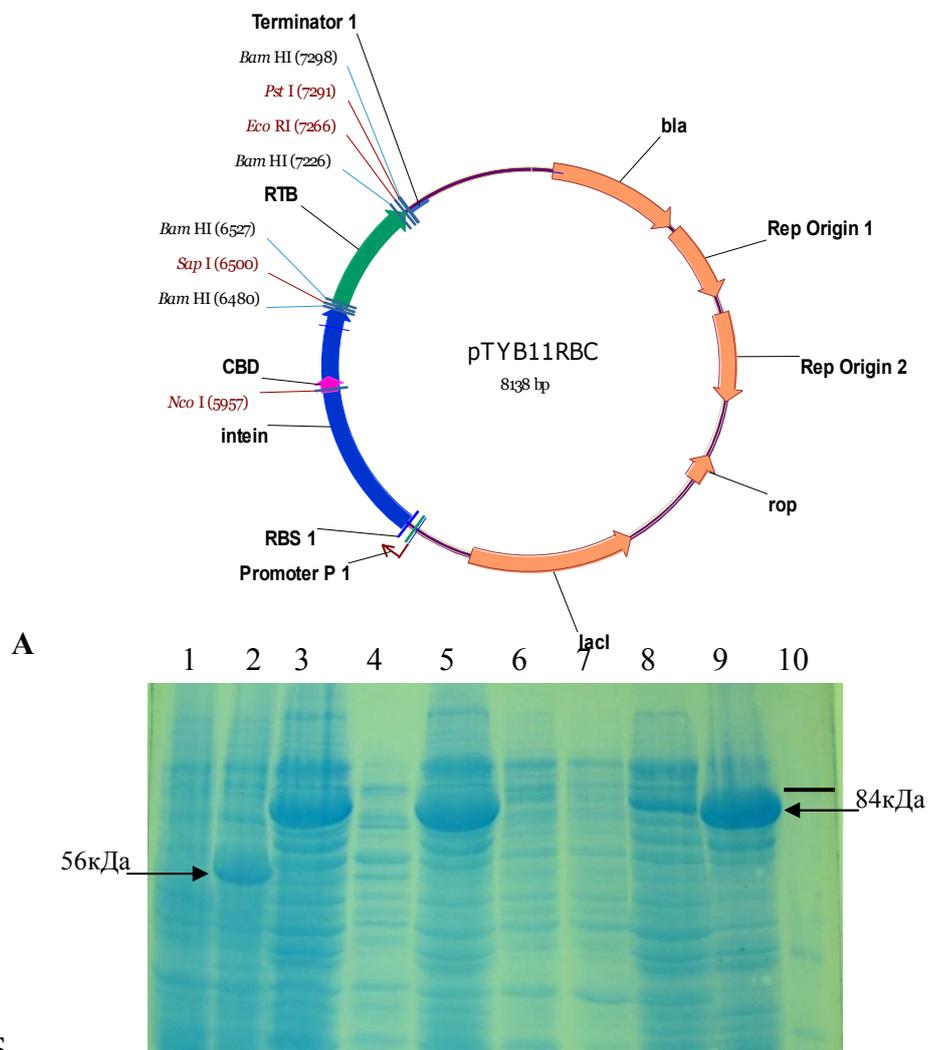
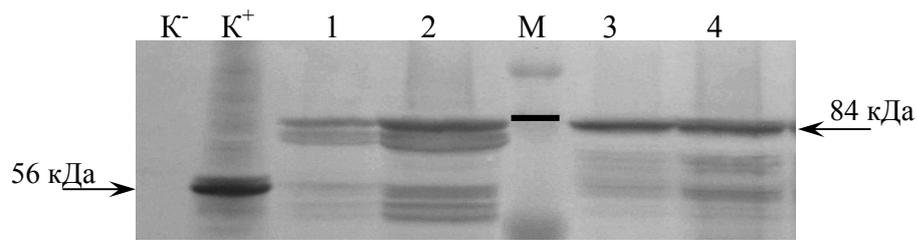
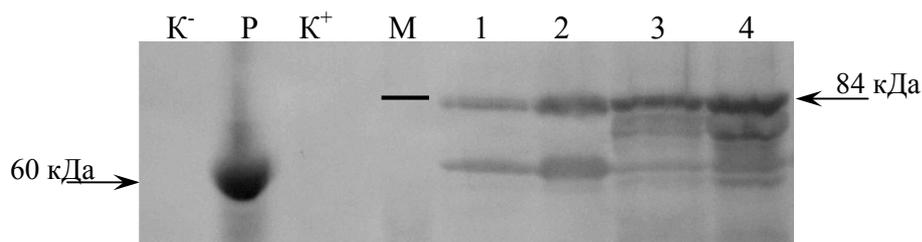


Рисунок 22 А- Схема полученного вектора рTYB11RBC, Б - Результат анализа экспрессии слитого гена интеин - RTB в клетках *E. coli* BL21(DE3), трансформированных вектором рTYB11RBC

Электрофоретическое разделение белков проводили в 10% полиакриламидном геле, который окрашивали с помощью Кумасси G250. Обозначения: 1- клетки BL21(DE3) рTYB11RBC до добавления ИПТГ; 2- клетки BL21(DE3) рTYB11 спустя 20 часов после добавления ИПТГ; 3- клетки BL21(DE3) рTYB11RBC(4) спустя 20 ч после начала индукции; 4,5- клетки BL21(DE3) рTYB11RBC(12) спустя 2 и 20 ч после начала индукции, соответственно; 6,7- клетки BL21(DE3) рTYB11RBC(5) спустя 2 и 20 ч после начала индукции; 8,9- клетки BL21(DE3) рTYB11RBC(10) спустя 2 и 20 ч после начала индукции; 10- маркеры молекулярной массы белков «Fermentas», чертой отмечен маркер 85 кДа. Стрелками указаны слитый белок интеин-субъединица Б рицина, массой 84 кДа и интеин, массой 56 кДа.



А



Б

**Рисунок 23 - Результат Вестерн- блот анализа экспрессии слитого гена интеин -
- субъединица Б рицина (RTВ) в клетках *E. coli* BL21(DE3). Детекцию проводили колориметрически с помощью хромогенного субстрата BCIP/NBT.**

А - с использованием антител к хитинсвязывающему домену (CBD), Б- с использованием антител к субъединице Б рицина. Обозначения: K⁻ - клетки BL21(DE3); K⁺ - индуцированные клетки BL21(DE3) pTYB11; 1,2 - клетки BL21(DE3) pTYB1RBC клон 12 после 4-х и 20-ти часов индукции, соответственно; 3,4 - клетки BL21(DE3) pTYB1RBC клон 10 после 4-х и 20-ти часов индукции, соответственно; P- нативный рицин, выделенный из семян клещевины; М- маркеры «Protein Molecular Weight» (“Fermentas”), чертой обозначены маркеры 85 кДа. Стрелками указаны интеин (56 кДа), слитый белок интеин-RTВ (84 кДа) и нативный рицин (60 кДа).

3.11 Получение и анализ трансгенных растений табака, содержащих последовательность слитого гена RTB-M130

Трансформация табака *Nicotiana tabacum L.* сорта *Petite Havana SR1* вектором pBIspRBM130 и отбор трансгенных растений проводились по методике Horsch с соавторами (Horsch et al., 1985), описанной в п.3.4. После трансформации было получено 15 независимых линий табака, устойчивых к канамицину. ПЦР- анализ тотальной ДНК полученных линий с использованием праймеров к гену *virC2*, характерному для *A. tumefaciens* (праймеры VirC1/VirC2, таблица 12) показал отсутствие агробактериальной контаминации в 14-ти линиях. Для подтверждения трансгенной природы полученных растений табака был проведен ПЦР-анализ геномной ДНК этих линий, с использованием двух пар праймеров 5727/M2-130rev и M2-130for/CBD_rev (таблица 12). Эти пары праймеров позволяют амплифицировать участок ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность сигнального пептида (spPR1) -субъединицы Б рицина (RTB)- 5'фрагмента гена M2 (M130) и M130- хитинсвязывающий домен (CBD), соответственно. В качестве положительного контроля использовали плазмиду pBIspRBM130, отрицательного – тотальную ДНК нетрансформированных растений табака. В результате было отобрано восемь линий трансгенных растений, содержащих слитую нуклеотидную последовательность spPR1-RTB-M130-CBD, далее обозначенную как RTB-M130 (рисунок 24А, Б). В последующем, отобранные линии трансгенных растений табака были укоренены и перенесены в теплицу для выращивания.

Анализ экспрессии слитой последовательности RTB-M130 в растениях табака был проведен после трех месяцев культивирования в теплице восьми трансгенных линий. Ранее рядом авторов был предложен высокоспецифичный метод анализа присутствия субъединицы Б рицина в экстрактах, основанный на высоком сродстве последнего к асиалофетуину – гликопротеину, получаемому из сыворотки крови (Fulton et al., 1986; Dawson et al., 1999). Асиалофетуин, сорбированный на полистироловых носителях, избирательно связывается с нативной субъединицей Б рицина, которая далее детектируется с помощью соответствующих антител.

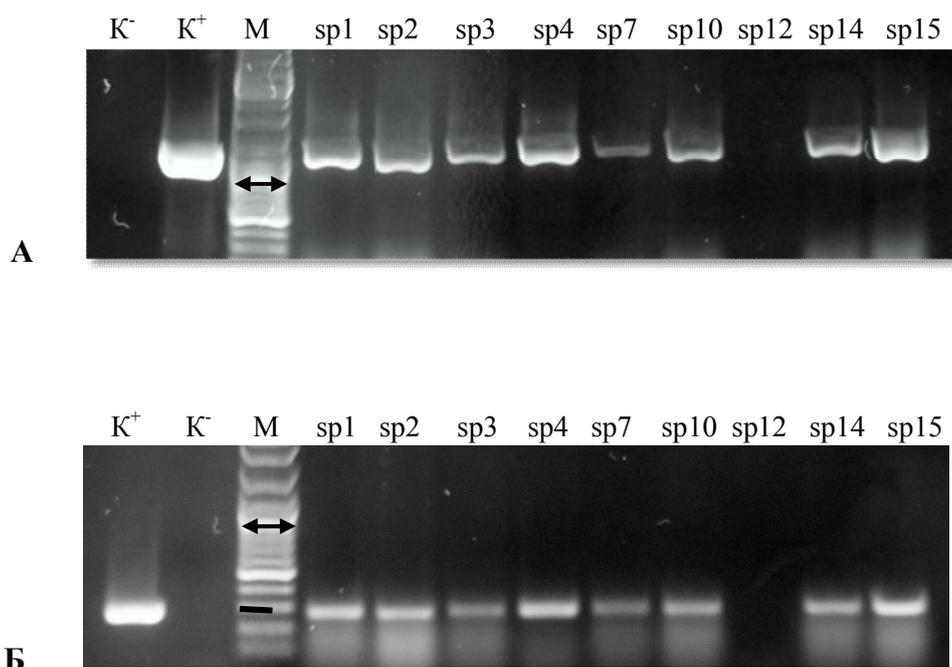


Рисунок 24 - Результат ПЦР-анализа геномной ДНК растений табака, трансформированных вектором pBIsprBVM130

А - с использованием пары праймеров 5727/M2-130rev к последовательности сигнальный пептид- субъединица Б рицина- 5'фрагмент гена M2 (spPR1-RTB-M130), ожидаемая длина фрагмента 1091 н.п.; **Б** - с использованием пары праймеров M2-130for/CBD_rev к последовательности 5'-фрагмент гена M2-хитинсвязывающий домен (M130-CBD), ожидаемая длина фрагмента 268 н.п.

Обозначения: sp1-15 - линии трансгенных растений табака; K⁻ –тотальная ДНК нетрансгенных растений табака; K⁺ – плазида pBIsprBVM130; M – ДНК-маркеры «Fermentas», стрелкой указан маркер 1000 н.п., чертой- 300 н.п.

Данная методика характеризуется высокой чувствительностью, позволяя детектировать даже небольшое количество субъединицы Б рицина в препаратах (Dawson et al., 1999, 2006). Кроме того, асиалофетуин - связанная ELISA позволяет судить также и об активности синтезированной субъединицы Б рицина, поскольку к взаимодействию с асиалофетуином способен только правильно процессированный белок, содержащий два сайта связывания с углеводами (Dawson et al., 2006; Blome et al., 2008).

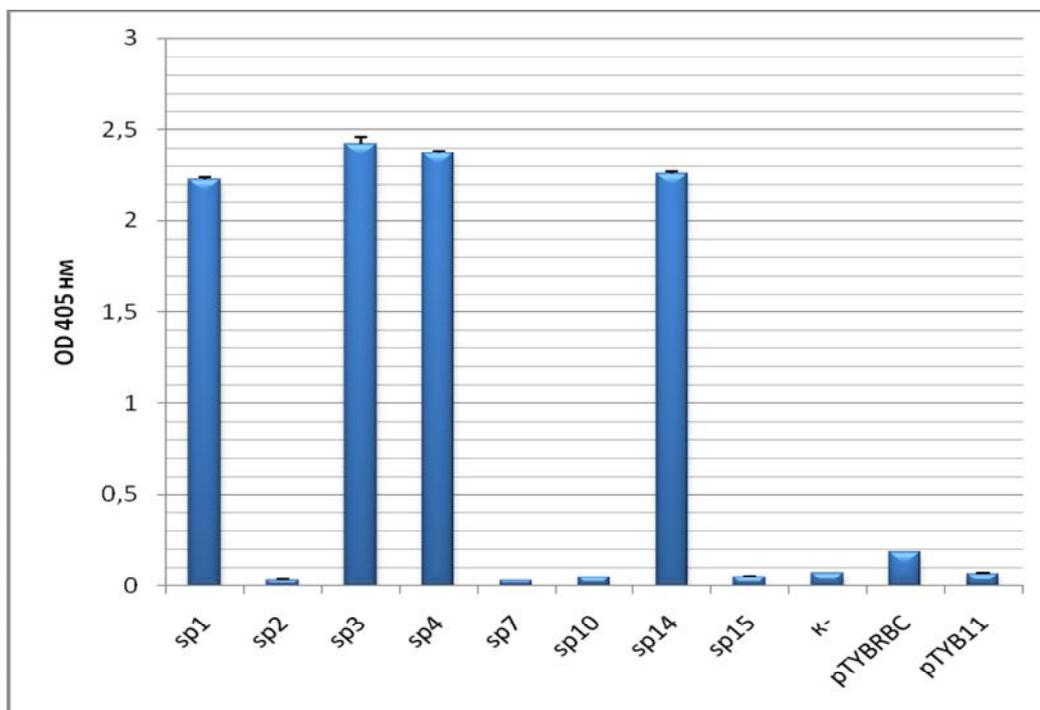
Экстракты общего белка трансгенных растений табака были получены и проанализированы с помощью асиалофетуина, как описано в главе «Материалы и методы». Для сравнения биологической активности субъединицы Б рицина, синтезируемой в трансгенных растениях табака, с RTB, полученной в бактериальной системе, были использованы осветленные лизаты клеток *E.coli* BL21(DE3) pTYB11RBC (клон 12), экспрессирующие слитую последовательность интеин- субъединица Б рицина, полученные как описано в пункте 3.10. В качестве отрицательного контроля были использованы экстракты нетрансгенных растений табака, а также лизаты клеток *E.coli* BL21(DE3)pTYB11, синтезирующих интеин (рисунок 22). Для количественной оценки синтеза целевого белка в трансгенных растениях табака был построен калибровочный график зависимости оптической плотности при длине волны 405 нм от содержания растительной субъединицы Б рицина, с использованием очищенных препаратов рицина, выделенного из семян местного сорта клещевины (*Ricinus communis*). Оценка количества общего растворимого белка в препаратах проводилась по методу Лоури (Lowry et al., 1951), описанному в главе «Материалы и методы».

Результаты анализа экстрактов трансгенных растений табака с помощью асиалофетуин-связанной ELISA представлены на рисунках 25 и 26. В четырех линиях трансгенных растений табака, обозначенных как sp1, sp3, sp4 и sp14, с использованием антител к субъединице Б рицина была показана экспрессия RTB в составе целевой последовательности. В лизатах *E.coli* BL21(DE3) pTYB11RBC(12), экспрессирующих слитую последовательность интеин - RTB, значение оптической

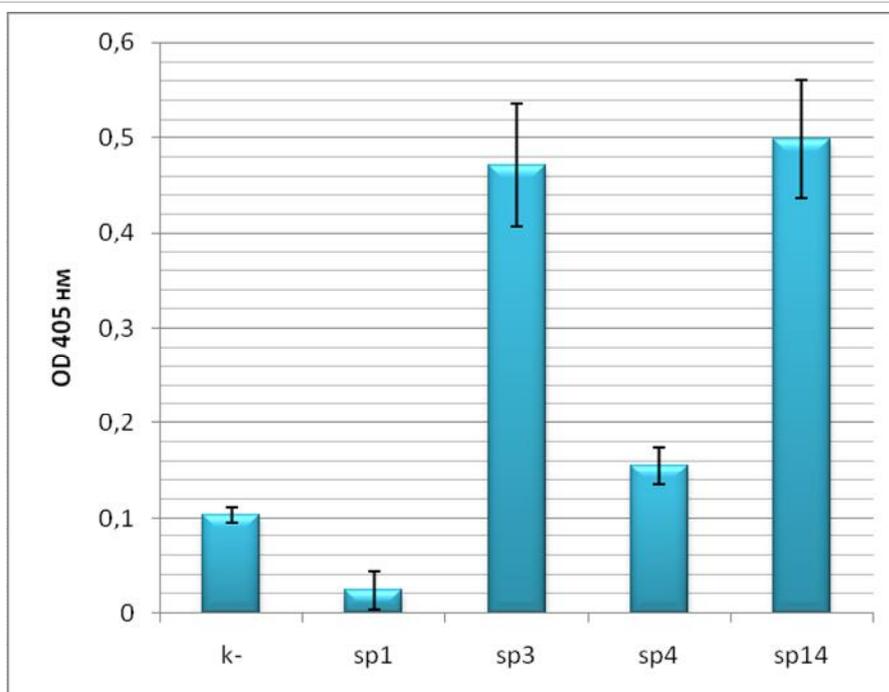
плотности при 405 нм находилось на уровне отрицательных контролей – лизатов клеток *E.coli* BL21(DE3) pTYB11 и экстрактов нетрансгенных растений табака (рисунок 25, А). Поскольку количество синтезированной последовательности субъединицы Б рицина в составе слитого белка в бактериальной системе было существенно больше, чем в растительных клетках (рисунок 22), полученные результаты позволили сделать вывод о корректном процессинге синтезируемой субъединицы Б рицина в составе целевого белка в четырех линиях трансгенных растениях табака.

При использовании антител к пептиду M2e, присутствие последовательности M130 в составе слитого белка было подтверждено в двух линиях трансгенных растений, sp3 и sp14 (рисунок 25, Б). Было сделано предположение, что отсутствие сигнала в двух других линиях, sp1 и sp4, может быть вызвано как невысоким уровнем экспрессии слитой последовательности в этих линиях, так и недостаточной чувствительностью антител к последовательности M2e в составе слитого белка RTB-M130, связанного с асиалофетуином.

Количество RTB в составе целевого белка, синтезированного в трансгенных растениях табака, было рассчитано с использованием антител к субъединице Б рицина (рисунок 26). В линиях sp14 и sp3 количество RTB достигало значений 2,42 и 3,26 мкг на грамм сырой массы листьев табака, что составляло 0,01 и 0,02 % от содержания общего растворимого белка в препаратах. Полученные результаты свидетельствуют о сопоставимой в сравнении с аналогичными работами экспрессии последовательности RTB в составе целевого белка в растениях табака (Woffenden et al., 2008). Так, в работе Воффендера с соавторами, при экспрессии последовательности субъединицы Б рицина слитой с F1- и V- антигенами *Yersinia pestis* в культуре клеток табака, количество синтезированной последовательности RTB, определенное с помощью асиалофетуина, составляло 0,015-0,025 % от общего растворимого белка. В последующем, синтезированный в растительных клетках слитый белок F1-RTB-V был использован для интраназальной иммунизации мышей, приведшей к успешному стимулированию мукозального иммунитета у последних.



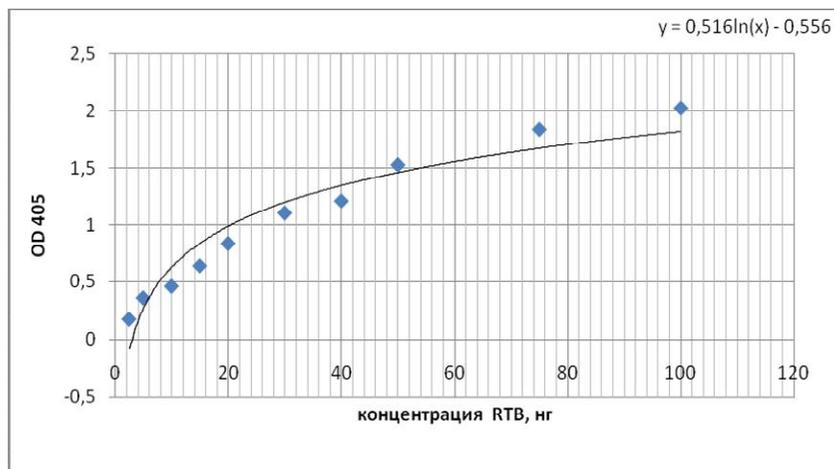
А



Б

Рисунок 25 - Результат анализа экспрессии слитой последовательности RTB-M130 в растениях табака, трансформированных вектором pBIsprBVM130, с помощью асиалофетуин-связанной ELISA

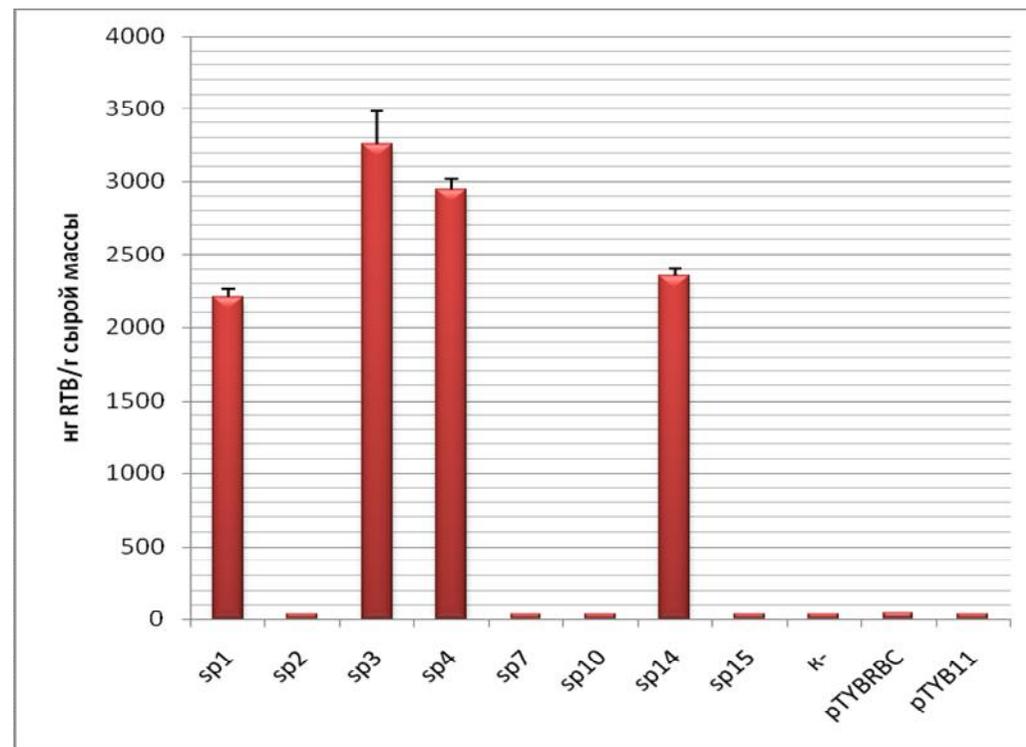
А - с использованием антител к субъединице Б рицина, Б - с использованием антител к пептиду M2e. Обозначения: sp1- 15 –линии трансгенных растений табака, содержащих последовательность RTB-M130; k⁻ - экстракт не трансформированного растения табака; pTYB11- осветленные лизаты клеток *E.coli* BL21(DE3), синтезирующих интеин; pTYBR11BC- осветленные лизаты клеток *E.coli* BL21(DE3), экспрессирующих слитую последовательность интеин- субъединица Б рицина.



А

| линия | OD ₄₀₅ | Мкг RTB/g FW | Мг TSP/g FW | % RTB |
|---------|-------------------|--------------|-------------|--------|
| sp1 | 2,3325 | 2,13 | 19,14 | 0,012 |
| sp2 | 0,136 | 0,03 | 18,4 | 0,0002 |
| sp3 | 2,812 | 3,29 | 20,14 | 0,02 |
| sp4 | 2,48 | 2,94 | 16,8 | 0,019 |
| sp7 | 0,132 | 0,03 | 19,3 | 0,0001 |
| sp10 | 0,155 | 0,04 | 19,9 | 0,0001 |
| sp14 | 2,3655 | 2,42 | 20,5 | 0,011 |
| sp15 | 0,157 | 0,03 | 16,4 | 0,0002 |
| k- | 0,176 | 0,00 | 18,5 | 0,00 |
| pTYB11 | 0,173 | 0,00 | 14,71 | 0,00 |
| pTYBRBC | 0,292 | 0,04 | 27,52 | 0,0002 |

В



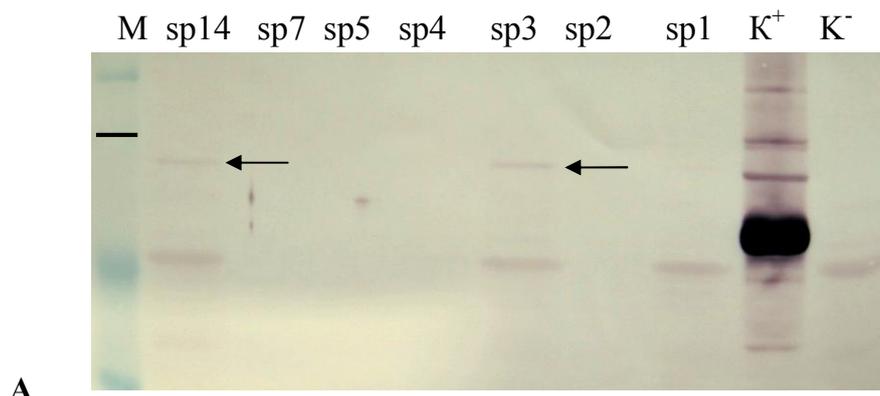
Б

Рисунок 26 - Результат количественного анализа экспрессии слитой последовательности RTB-M130 в растениях табака, трансформированных вектором pBIsprRBM130, с помощью асиалофетуин-связанной ELISA

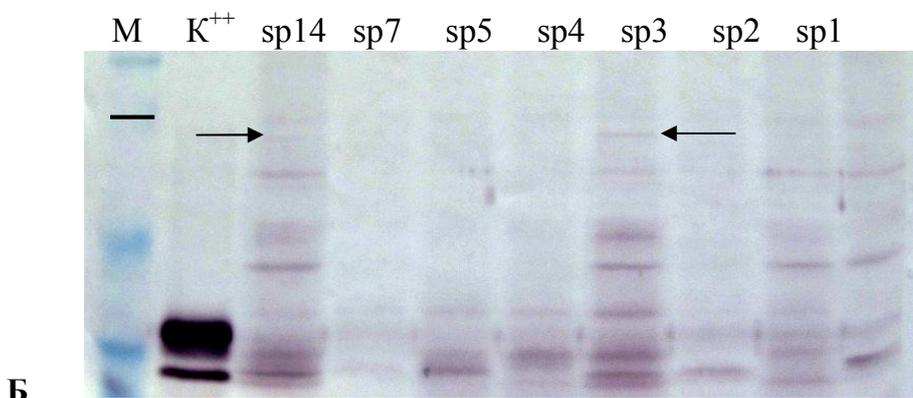
А - калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации субъединицы Б рицина в препаратах, по оси абсцисс содержание RTB в нг (для построения было взято 5- 100 нг препарата); Б - содержание субъединицы Б рицина (RTB) на грамм сырого веса (FW) в различных линиях трансгенных растений; В - обобщающая таблица концентрации общего растворимого белка (TSP), содержания субъединицы Б рицина (RTB) на грамм сырого веса (FW) и %-го содержания RTB по отношению к общему растворимому белку в препаратах различных линий трансгенных растений табака. Линий¹⁷ трансгенных растений обозначены как на рисунке 25.

Полученные данные свидетельствовали об активности полученного с помощью экспрессии в трансгенных растениях табака антигена (Woffenden et al., 2008).

Для подтверждения экспрессии целевой последовательности RTВ-M130 в трансгенных растениях табака, экстракты отобранных линий были проанализированы методом Вестерн-блот с использованием коммерческих антител к субъединице Б рибина и пептиду M2e. При использовании антител к пептиду M2e было показано, что в двух линиях трансгенных растений табака, обозначенных как sp14 и sp3, синтезируется целевой продукт размером около 80-82 кДа (рисунок 27, А). В двух других линиях трансгенных растений табака, содержащих слитую последовательность RTВ-M130, sp1 и sp4, так же как и в отрицательном контроле, антитела к M2e не детектировали данный белок. Рассчитанный размер для аминокислотной последовательности целевого продукта с учетом возможных вариантов гликозилирования, составляет от 39 до 42 кДа. Тем не менее, ввиду высокой специфичности используемых антител к пептиду M2e, а также отсутствию в нетрансгенных растениях табака (отрицательный контроль при Вестерн- блот анализе) подобного полипептида, было высказано предположение, о том, что целевая последовательность субъединица Б рибина- M130 может синтезироваться в трансгенных растениях табака в виде димера. Косвенным подтверждением этого предположения может служить работа Картера с соавторами в которой проводили анализ синтеза инсулина, слитого с субъединицей Б рибина, в трансгенных растениях картофеля (*Solanum tuberosum*). Методом Вестерн- блот анализа с использованием специфических антител, авторы показали, что синтез аминокислотной последовательности инсулин-RTВ в клубнях картофеля приводит к образованию мультимерных агрегатов из целевого белка. По мнению авторов, мультимеризация происходит за счет большого количества хаотичных дисульфидных связей в слитом белке инсулин-RTВ (Carter et al., 2010).



А



Б

Рисунок 27 - Результат Вестерн-блот анализа трансгенных растений табака, содержащих слитую последовательность субъединица Б рицина – М130. Детекцию проводили колориметрически с помощью хромогенного субстрата ВСІР/НВТ

А - антитела к пептиду М2е, **Б** - антитела к субъединице Б рицина (RTB). **Обозначения:** sp1-14- линии трансгенных растений табака; K⁻ - экстракт не трансгенного табака; K⁺ - пептид М130, синтезированный в бактериальных клетках; K⁺⁺ - рицин, выделенный из семян клещевины; М- Prestained Protein Marker («Fermentas»), чертой обозначен маркер 85 кДа. Стрелками указан слитой протеин RTB-М130 (предполагаемый димер, размером около 80 кДа).

При Вестерн- блот анализе с использованием антител к субъединице Б рицина, детектировался ряд полос как в препаратах тотального белка трансгенных растений, так и в препаратах нетрансформированных растений табака, что могло являться результатом присутствия в использованных антителах («Abscam», Великобритания, номер ab27170) антител к другим растительным белкам (рисунок 27, Б). Тем не менее, присутствие аминокислотной последовательности размером около 80 кДа, не детектируемой в отрицательных контролях, было подтверждено в линиях sp14 и sp3 трансгенных растений табака (рисунок 27, Б), что также может являться косвенным подтверждением версии о димеризации целевого продукта. Отсутствие четкого сигнала в двух других линиях, sp1 и sp4, может быть вызвано не столько низким содержанием целевого белка и недостаточной чувствительностью антител, но и более быстрой деградацией RTB-M130 в этих линиях, о чем свидетельствует наличие сигнала в ряде полосе более низкого молекулярного веса.

Результаты асиалофетуин-связанной ELISA с использованием антител к RTB и к пептиду M2e, свидетельствуют о наличии правильно процессированной субъединицы Б рицина в составе слитой последовательности RTB-M130 в двух линиях трансгенных растений табака. В связи с этим, можно предположить, что в данном случае, как и в работе Картера с соавторами, димеризация целевого протеина не приводит к потере его активности (Carter et al., 2010), что позволяет использовать линии sp14 и sp3 трансгенных растений табака в дальнейшей работе.

3.12 Анализ экспрессии гена пептида M2e в трансгенных растениях ряски

Трансформация растений ряски (*Lemna minor*) векторами pBIM130 и pBIspRBM130 проводилась сотрудниками лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) под руководством с.н.с. к.б.н. Митюшкиной Т.Ю. по разработанной ранее оригинальной методике.

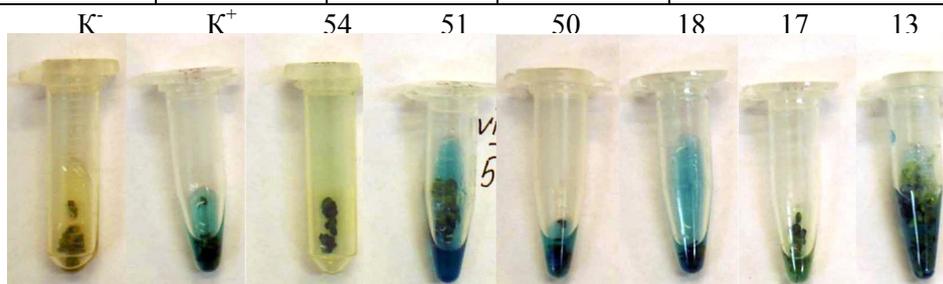
3.12.1 Анализ экспрессии слитого гена пептид M2e- β-глюкуронидаза

Растения ряски малой, трансформированные вектором pVIM130, растущие в жидкой селективной среде с канамицином, были проанализированы на активность β-глюкуронидазы как описано в п.2.15. В результате гистохимического анализа для дальнейших исследований было отобрано 35 линий растений, окрашивающихся наиболее интенсивно (рисунок 28, А, Б). Методом ПЦР - анализа с использованием праймеров к гену *virC2* (таблица 12) тотальная ДНК отобранных линий была проверена на наличие агробактериальной контаминации. В результате было показано отсутствие амплификации фрагмента гена *virC2* в 21-й канамицинустойчивых линиях, что говорило об элиминации *A. tumefaciens* в процессе культивирования трансформированных растений. Для подтверждения вставки целевого фрагмента M130 в геном трансформантов, был проведен ПЦР-анализ тотальной растительной ДНК с праймерами M2-130for/uidA_low (таблица 12), позволяющими амплифицировать участок ДНК размером 1024 н.п., содержащий последовательность M130 и фрагмент гена β-глюкуронидазы. В результате наличие слитого гена M130- β-глюкуронидаза было показано в геномной ДНК всех 21-й предварительно отобранных линиях ряски (рисунок 28, А, В, Г).

После подтверждения трансгенной природы полученных растений, был проведен анализ экспрессии целевой последовательности M130- β-глюкуронидаза в 20-ти отобранных линиях ряски. Методом вестерн-блот анализа общего белка, выделенного из трансгенных листочков, с использованием антител к β-глюкуронидазе было показано присутствие в препаратах белковых полос молекулярной массой около 74кДа, что соответствовало ожидаемому размеру слитого белка M130- β-глюкуронидаза (74 кДа).

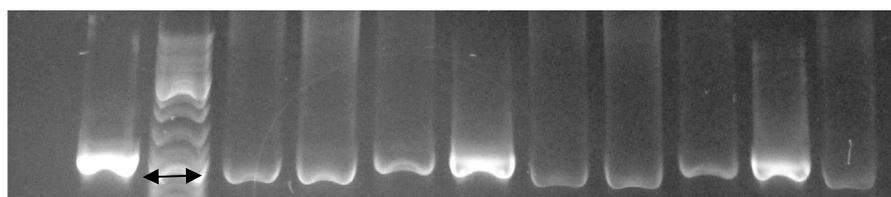
| Количество линий ряски pVIM130 | Km ^R | GUS ⁺ | virC ⁻ | Целевой ПЦР- фрагмент |
|--------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------------|
| | | 115 | 35 | 21 |

А



Б

K⁻ K⁺ M 13 14 16 17 18 19 34 49 50



В

51 52 54 58 71 72 73 74 93 96 99 M

Г

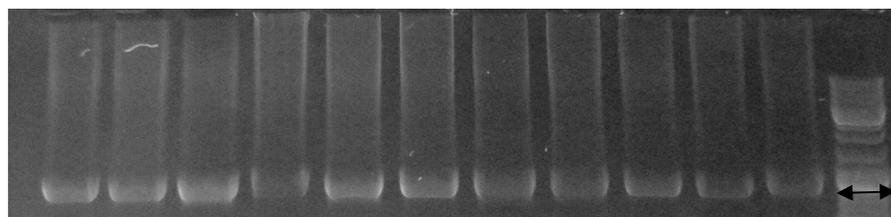
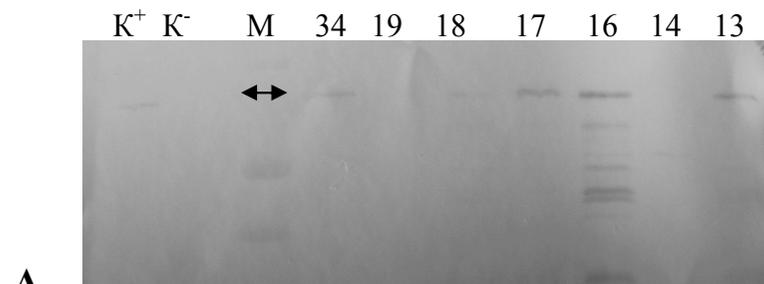


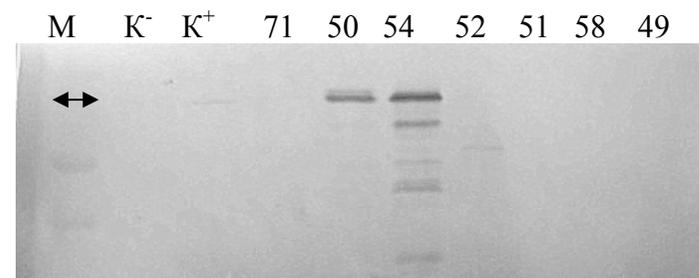
Рисунок 28 - Результаты анализа растений ряски, трансформированных вектором pVIM130

А. – Таблица эффективности трансформации растений ряски вектором pVIM130: Km^R - устойчивые к канамицину линии, GUS⁺ - положительное окрашивание X-GLUC, virC⁻ - линии, не содержащие агробактерий; Б - Результат окрашивания субстратом 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронида (X-GLUC, «Fermentas») некоторых канамицинустойчивых листецов ряски. Цифрами обозначены различные линии ряски, K⁻ - нетрансгенное растение, K⁺ - трансгенное растение, трансформированное вектором pV1121; В, Г - Результат ПЦР-анализа тотальной ДНК, выделенной из некоторых канамицинустойчивых линий ряски с использованием праймеров M2-130for/ uidA_low. K⁻ - нетрансформированное растение, K⁺ - плазида pVIM130, цифрами обозначены различные линии ряски, М- ДНК маркеры «Fermentas», стрелкой указан маркер 1000 н.п. Ожидаемая длина фрагмента- 1024 н.п.

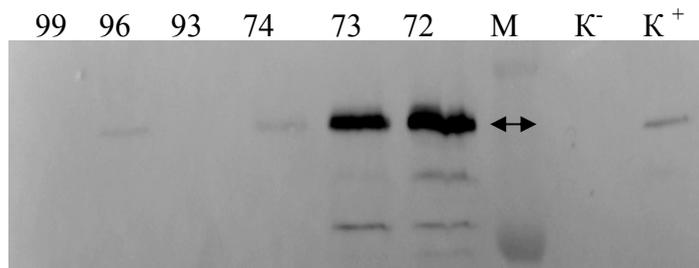
В качестве отрицательного контроля были использованы нетрансгенные растения ряски, положительного - растения, трансформированные вектором pV1121. Присутствие целевого белка было показано в препаратах 12-ти линий трансгенных растений ряски, обозначенных под номерами 13, 16, 17, 18, 34, 51, 54, 50, 71, 72, 73, 96 (рисунок 29А, Б, В). Как показано на приведенных рисунках детектируемые антителами полосы в трансгенных линиях ряски располагаются на мембране несколько выше относительно положительного контроля, β -глюкуронидазы, что свидетельствует о наличии пептидного «довеска». Далее был проведен вестерн-блот анализ белковых препаратов трансгенных растений ряски с использованием антител к пептиду M2e. При гибридизации с антителами к пептиду M2e, фрагмент белка M2e детектировался только в 8-ми линиях ряски - 13, 17, 18, 50, 51, 54, 72, и 73 (рисунок 29, Г). Масса узнаваемой антителами аминокислотной последовательности составляла около 74 кДа, что соответствовало фрагменту, детектируемому с помощью антител к β -глюкуронидазе. В препаратах белка из нетрансгенных растений, так же как и растений, экспрессирующих только β -глюкуронидазу, соответствующий сигнал отсутствовал. При сравнении этих данных с ранее полученными результатами вестерн-блот анализа трансгенных растений табака, содержащих последовательность M130- β -глюкуронидаза, было установлено, что размер детектируемой в трансгенных растениях ряски аминокислотной последовательности совпадает с размером изучаемого белка в трансгенных линиях табака. Кроме того, при равном количестве общего белка, наносимого на одну дорожку при вестерн-блот анализе с использованием антител к пептиду M2e и к β -глюкуронидазе, препараты трансгенных растений ряски демонстрировали более сильный сигнал в сравнении с белковыми препаратами трансгенных растений табака. Полученные данные могут служить подтверждением более высокого уровня синтеза слитого белка M130- β -глюкуронидаза в растениях ряски малой в сравнении с растениями *Nicotiana tabacum*.



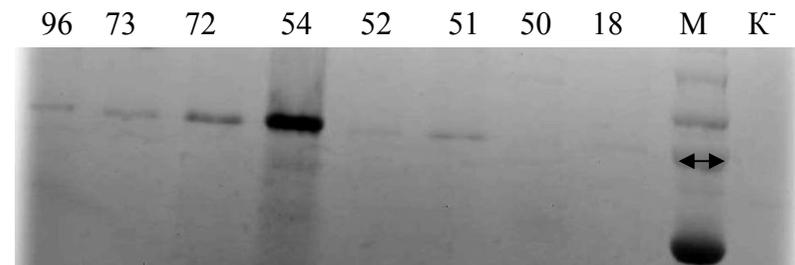
A



Б



В



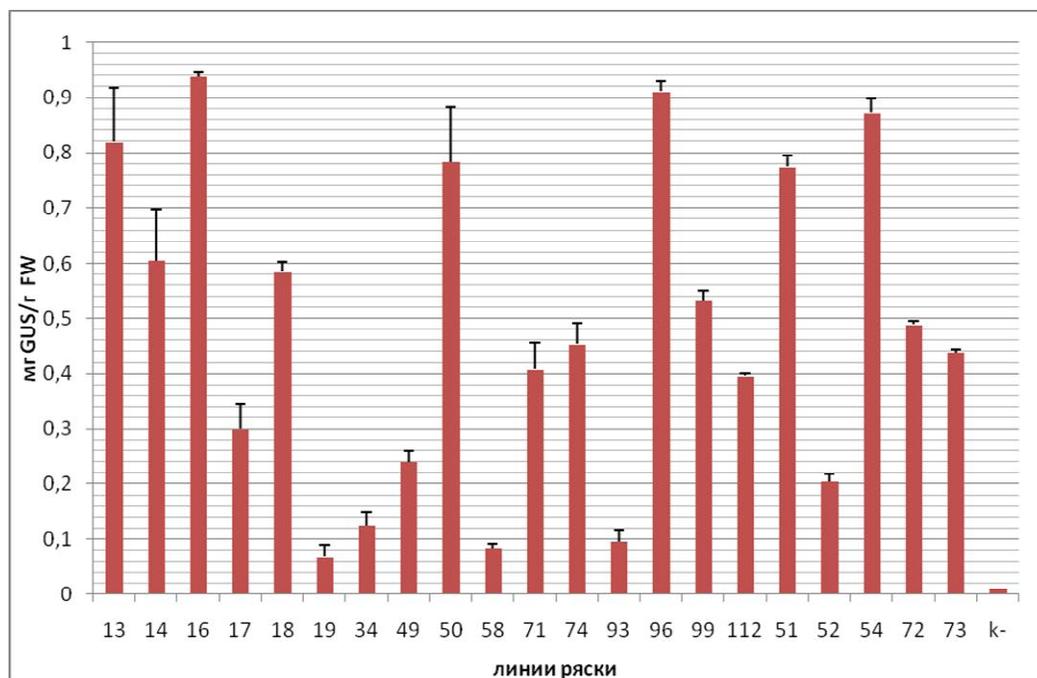
Г

Рисунок 29 - Результат Вестерн-блот анализа трансгенных растений ряски, трансформированных вектором pВIM130, с использованием антител к β -глюкуронидазе (А, Б, В) и белку M2 (Г)

Детекцию проводили колориметрически с помощью хромогенного субстрата ВСIP/NBT. Цифрами обозначены линии трансгенных растений ряски, K^+ - растение, трансформированное вектором pВI121, K^- - нетрансгенное растение, М- маркеры молекулярного веса белков «BioRad», фигурой \leftrightarrow обозначен маркер 75 кДа, ожидаемый размер детектируемого белка - 74 кДа.

В последующем была проведена количественная оценка содержания слитого белка М130-β-глюкуронидаза в препаратах общего растворимого белка трансгенных растений ряски методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием антител к β-глюкуронидазе как описано в главе «Материалы и методы». Калибровочный график был построен с использованием препарата очищенной β-глюкуронидазы производства компании «Sigma» (США). В результате было показано, что количество синтезируемой β-глюкуронидазы в трансгенных растениях ряски находится на уровне 0,1-0,9 мг на грамм сырого веса, что составляет от 0,11% (линии 19, 58) до 2% (линии 72, 54) от общего растворимого белка в отдельных линиях (рисунок 30 А, Б). Полученные результаты являются хорошим показателем для подобных работ. Так, например, в работе Вигдоровица с соавторами (Wigdorovitz et al., 2004) уровень экспрессии β-глюкуронидазы в слиянии с пептидом eBRV4a белка оболочки VP4 бычьего ротавируса составлял в растениях трансгенной люцерны порядка 0.4–0.9 мг на грамм тотального растворимого белка, а в работе коллектива авторов из Университета Северной Каролины уровень экспрессии эндоглюконаза E1 из *Acidothermus cellulolyticus* в растениях ряски малой составлял 0,24% от общего растворимого белка (Sun et al., 2007).

Таким образом, нами был достигнут высокий уровень экспрессии синтетической последовательности М130 в трансляционном слиянии с геном β-глюкуронидазы в трансгенных растениях ряски, что позволило перейти к следующему этапу работы.



А

Рисунок 30 - Результат иммуноферментного анализа экспрессии слитого белка M130-GUS в трансгенных линиях ряски.

А- содержание β -глюкуронидазы (GUS) на грамм сырого веса (FW) в исследуемых линиях трансгенных растений, **Б-** таблица рассчитанной концентрации общего растворимого белка (TSP), содержания GUS на грамм сырого веса (FW) и %-го содержания GUS по отношению к TSP в препаратах различных линий трансгенных растений ряски. Цифрами обозначены линии ряски, К⁻ - нетрансгенное растение ряски

| Линии ряски | мг TSP/г FW | мг GUS/г FW | % GUS/TSP |
|----------------|-------------|-------------|-----------|
| M130-GUS | | | |
| 13 | 44,4 | 0,819 | 1,84 |
| 14 | 48,6 | 0,606 | 1,25 |
| 16 | 48,3 | 0,939 | 1,94 |
| 17 | 46,5 | 0,3 | 0,65 |
| 18 | 51 | 0,585 | 1,15 |
| 19 | 50,7 | 0,068 | 0,11 |
| 34 | 50,4 | 0,125 | 0,43 |
| 49 | 36 | 0,24 | 0,67 |
| 50 | 41,4 | 0,782 | 1,9 |
| 51 | 38,7 | 0,773 | 2 |
| 52 | 42,2 | 0,204 | 0,48 |
| 54 | 45,7 | 0,873 | 2 |
| 58 | 49,2 | 0,084 | 0,3 |
| 71 | 48,9 | 0,408 | 0,83 |
| 72 | 43,6 | 0,489 | 1,12 |
| 73 | 46,2 | 0,438 | 0,95 |
| 74 | 36 | 0,453 | 1,26 |
| 93 | 35,7 | 0,096 | 0,27 |
| 96 | 49,2 | 0,912 | 1,85 |
| 99 | 37,5 | 0,531 | 1,42 |
| 112 | 33,6 | 0,396 | 1,18 |
| К ⁻ | 31,6 | 0,0 | 0,0 |

Б

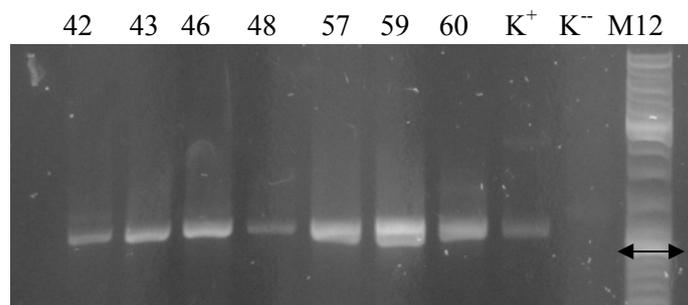
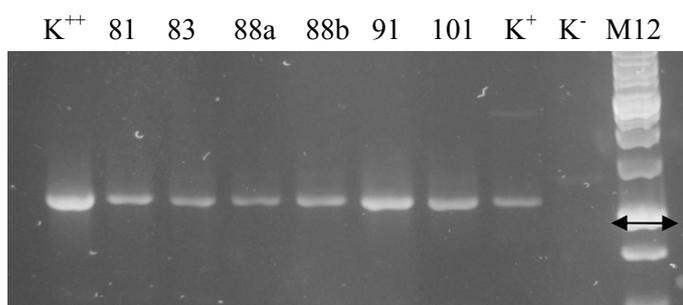
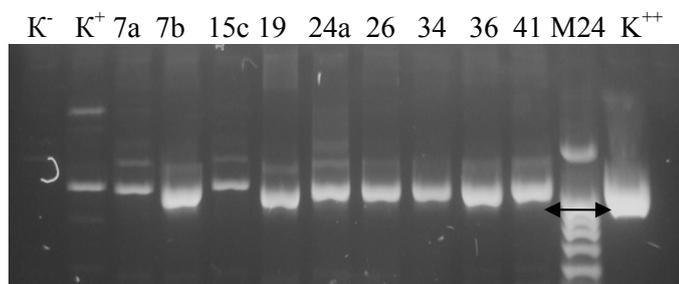
3.12.2 Анализ экспрессии последовательности пептида M2e слитой с субъединицей Б рицина

После трансформации ряски вектором pBIsprBVM130 было получено 24 независимые линии растений, устойчивых к канамицину. ПЦР- анализ тотальной ДНК полученных линий с использованием праймеров к гену *virC2* (VirC1/VirC2, таблица 12) показал отсутствие агробактериальной контаминации в 23-х линиях. Для подтверждения трансгенной природы полученных растений ряски был проведен ПЦР-анализ геномной ДНК этих линий, с использованием пары праймеров 5727/M2-130rev (таблица 12), позволяющих амплифицировать участок ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность сигнального пептида PR1(sp)-субъединицы Б рицина (RTB)- 5'фрагмента гена M2 (M130). В качестве положительного контроля использовали плазмиду pBIsprBVM130, а также тотальную ДНК растений табака, трансформированных вектором pBIsprBVM130 линии sp3 (п. 3.11), в качестве отрицательного - тотальную ДНК нетрансгенных растений ряски. В результате, во всех анализируемых линиях была показана амплификация фрагмента ДНК, содержащего последовательность sp-RTB-M130, размером около 1100 н.п., что соответствовало ожидаемому (1091 н.п., рисунок 31).

Анализ экспрессии слитой последовательности sp-RTB-M130-CBD, далее обозначенной как RTB-M130, в полученных линиях трансгенных растений ряски был проведен с помощью асиалофетуин-связанной ELISA с использованием антител к субъединице Б рицина, в условиях описанных в п. 3.11. Препараты общего белка трансгенных растений ряски были выделены из листочков, пролиферирующих один месяц на селективной культуральной среде, как описано в главе «Материалы и методы». В качестве негативного контроля были использованы экстракты нетрансгенных растений ряски, позитивного - трансгенные растения табака линии sp14.

| Количество линий ряски pBIspRBM130 | Km ^R | virC ⁻ | Целевой ПЦР-фрагмент |
|--|-----------------|-------------------|----------------------|
| | | 24 | 23 |

А



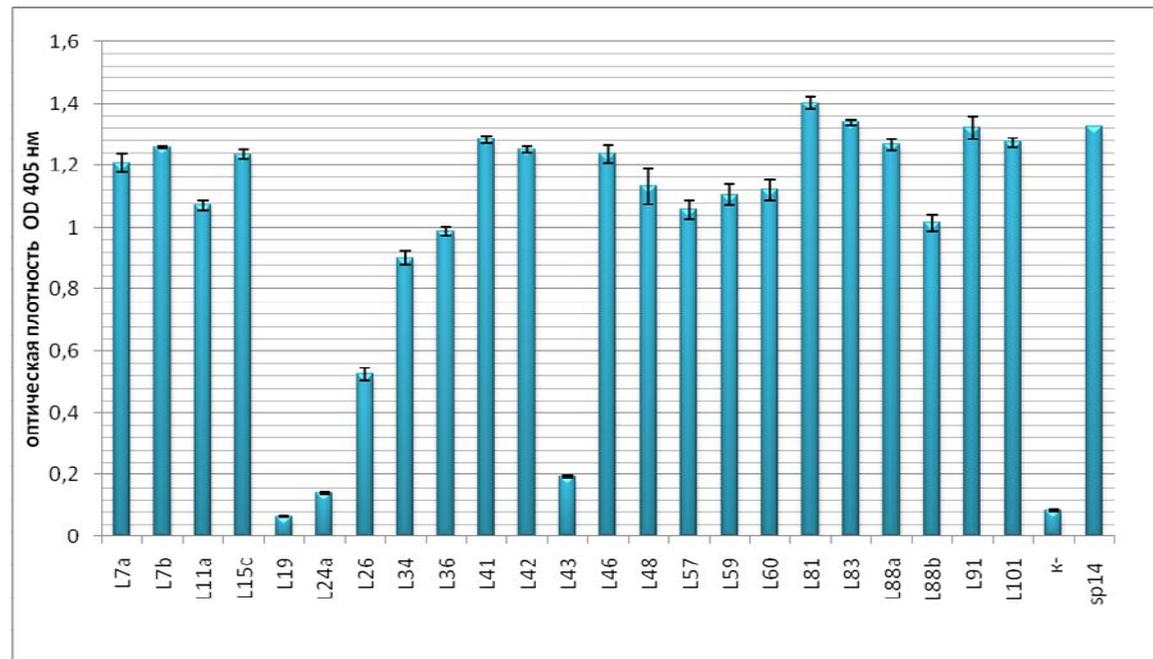
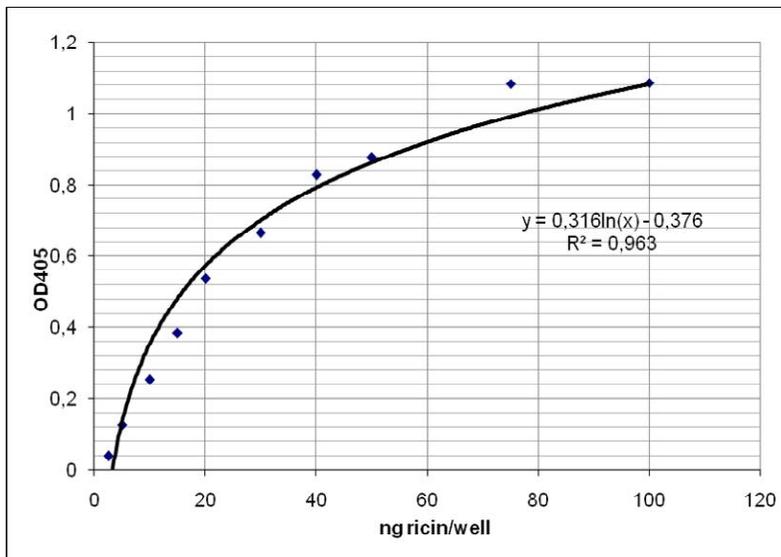
Б

Рисунок 31- Результат анализа растений ряски, трансформированных вектором pBIspRBM130

А - Таблица эффективности трансформации растений ряски вектором pBIspRBM130: Km^R - устойчивые к канамицину линии, virC⁻ - линии, не содержащие агробактерий; **Б - Результат ПЦР-анализа геномной ДНК ряски с использованием пары праймеров 5727/M130_rev.** Цифрами обозначены линии трансгенных растений ряски, содержащих нуклеотидную последовательность сигнального пептида PR1(sp)-субъединицы Б рицина (RTB)- 5'фрагмента гена M2 (M130); K⁻ – геномная ДНК нетрансгенных растений ряски, K⁺ – геномная ДНК трансгенного табака линии sp3; K⁺⁺ – плазмида pBIspRBM130; M24, M12 – ДНК-маркеры «СибЭнзим», стрелкой указан маркер размером 1000 н.п. Ожидаемая длина фрагмента 1091 н.п.

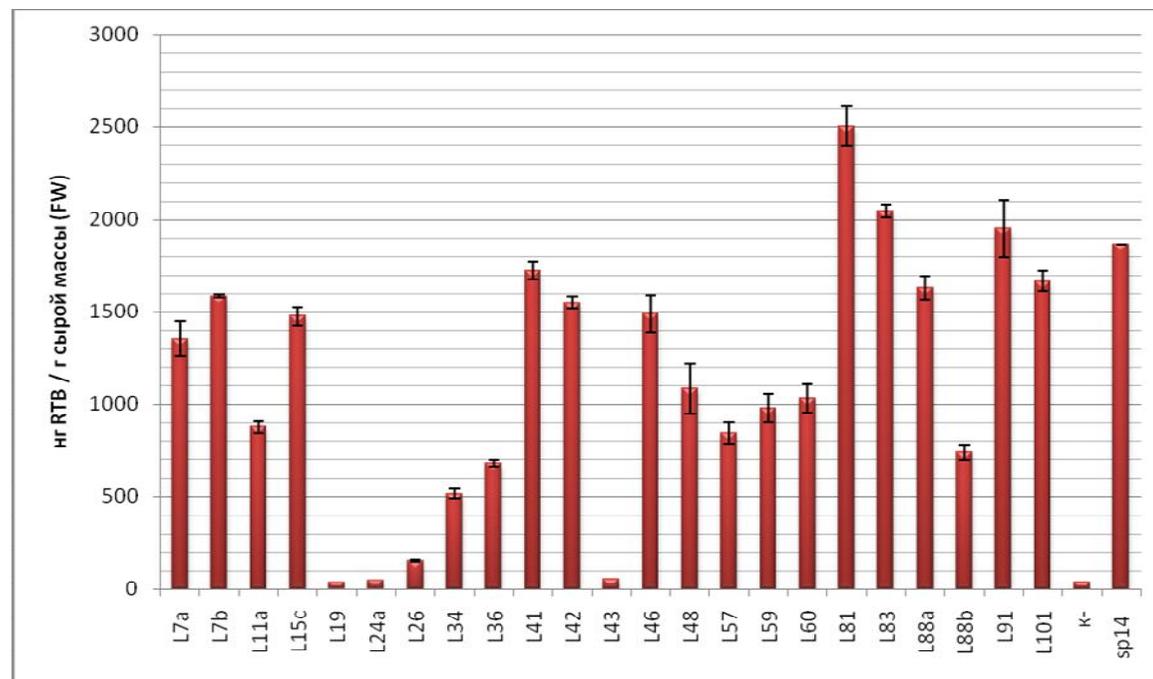
Для количественной оценки синтеза субъединицы Б рицина в трансгенных растениях ряски так же был построен калибровочный график зависимости оптической плотности препарата при длине волны 405 нм от содержания нативной субъединицы Б рицина, с использованием очищенных препаратов рицина, выделенного из семян местного сорта клещевины *Ricinus communis* (рисунок 32, А). Оценка количества общего растворимого белка в препаратах была проведена по методу Лоури (Lowry et al., 1951), описанному в главе «Материалы и методы». В результате синтез активной субъединицы Б рицина в составе слитого белка был показан в 20-ти линиях трансгенных растений ряски из 23-х (рисунок 32, Б). Количественное содержание слитого белка в различных линиях варьировало от 0,5 мкг на грамм сырого веса (линии 34, 36) до 2-2,5 мкг на грамм сырого веса (линии 81, 91). В процентном содержании по отношению к общему растворимому белку это составляло от 0,004% до 0,01% (рисунок 32, В). Кроме того было отмечено, что количество слитого белка RTB-M130 в трансгенных растениях табака, взятого в качестве позитивного контроля, составляло порядка 2,4 мкг на грамм сырого веса, что было несколько выше, чем в большинстве изученных линий трансгенных растений ряски (таблица 14). Процентное содержание субъединицы Б рицина по отношению к общему белку также было выше в растениях табака, чем в некоторых линиях ряски, что может быть связано с большим количеством общего белка в последней.

При сравнении результатов анализа экспрессии субъединицы Б рицина с полученными ранее данными о синтезе последовательности β -глюкуронидазы, следует отметить, что уровень накопления последней в трансгенных растениях ряски (порядка 2% от тотального растворимого белка) намного превосходит уровень синтеза слитой последовательности RTB-M130. Наблюдаемые отличия могут иметь несколько причин.



Б

Рисунок 32 - Результат анализа экспрессии последовательности RTB-M130 в трансгенных растениях ряски различных линий с помощью асиалофетуин-связанной ELISA



В

А- калибровочная кривая для расчета количества RTB в пробах; **Б-** значения оптической плотности при длине волны 405 нм в исследуемых препаратах; **В-** содержание RTB в исследуемых линиях трансгенных растений в нг на грамм сырого веса (FW). Обозначения: L7a – L101 - различные линии трансгенных растений ряски; sp14- линия трансгенного табака, содержащего последовательность RTB-M130; K⁻ - нетрансгенная ряска.

Во-первых, при использовании асиалофетуина в иммуноферментном анализе учитывается только правильно процессированный, биологически активный белок субъединицы Б рицина (Fulton et al., 1986), при этом общее количество синтезированной RTB может быть существенно выше, чем это следует из результатов теста. Во-вторых, субъединица Б рицина может более активно, чем β -глюкуронидаза подвергаться деструкции, вследствие чего её меньше накапливается в растительных клетках (Chamberlain et al., 2008). В-третьих, N-терминальный фрагмент слитого белка M130- β -глюкуронидаза представлен последовательностью с оптимизированным для ряски кодонным составом, тогда как в слитом белке RTB-M130 N-терминальный фрагмент кодируется неоптимизированной последовательностью сигнального пептида PR1 табака, что также может существенно повлиять на уровень экспрессии гетерологичной последовательности (Lin et al., 2002; Hatfield et al., 2007).

В последующем был проведен Вестерн- блот анализ полученных 23-х линий трансгенных растениях ряски, содержащих последовательность RTB-M130 с использованием антител к пептиду M2e, с целью подтверждения присутствия пептида M2e в слитом протеине. Как представлено на рисунке 33, в тринадцати из 23-х линиях трансгенных растений антитела к пептиду M2e узнают продукт размером около 80-82 кДа, не детектируемый в контрольных, нетрансформированных, растениях (ожидаемый размер целевого белка RTB-M130 42,2 кДа без учета гликозилирования). Размер протеинов, детектируемых в трансгенных растениях ряски линий 11а, 24а, 26, 36, 41, 43, 46, 48, 59, 83, 88а и 101 соответствует предполагаемому димерному варианту слитой последовательности RTB-M130, синтезируемой в трансгенных растениях табака линий sp3 и sp14 (рисунок 27, А). Помимо этого, в отличие от табака, в ряде линий трансгенной ряски антитела к пептиду M2e специфически связываются с еще более высокомолекулярным продуктом размером около 160 кДа, что позволяет предполагать наличие тетрамерных вариантов целевой последовательности RTB-M130. По-видимому, мультимеризация является характерным процессом при

экспрессии гетерологичных белков, включающих последовательность субъединицы Б рицина. Так, Картер с соавторами исследовали экспрессию в трансгенном картофеле инсулина (Ins) в трансляционном слиянии с RTB. Слитый белок Ins- RTB синтезировался только в виде тетрамеров и ещё более высокомолекулярных структур, экспрессия Ins- RTB в виде мономеров не наблюдалась (Carter et al., 2010).

Поскольку результаты асиалофетуин-связанной ELISA в линиях 7a, 7b, 34, 57, 15c, 91 свидетельствуют о наличии правильно процессированной субъединицы Б рицина, можно предполагать, что мультимеризация целевого протеина не приведёт к потере его активности. Необходимо отметить, что агрегация слитого белка Ins-RTB не стала препятствием для выработки специфических антител при иммунизации животных (Carter et al., 2010).

Таким образом, с помощью методов иммуноферментного и вестерн-блот анализов был показан синтез слитого белка RTB- M130 в 20-ти из 23-х полученных трансгенных линиях растений ряски. Обобщенные результаты анализа экспрессии последовательности RTB-M130 в трансгенных растениях ряски представлены в приведенной таблице 14. На основании этих данных в дальнейшей работе по анализу выработки специфических к пептиду M2e антител при иммунизации животных растительным материалом оптимально использовать пять линий трансгенных растений ряски (41, 46, 81, 83, 101), накапливающих наибольшее количество целевого белка на один грамм сырой массы и в процентном соотношении к тотальному растворимому белку.

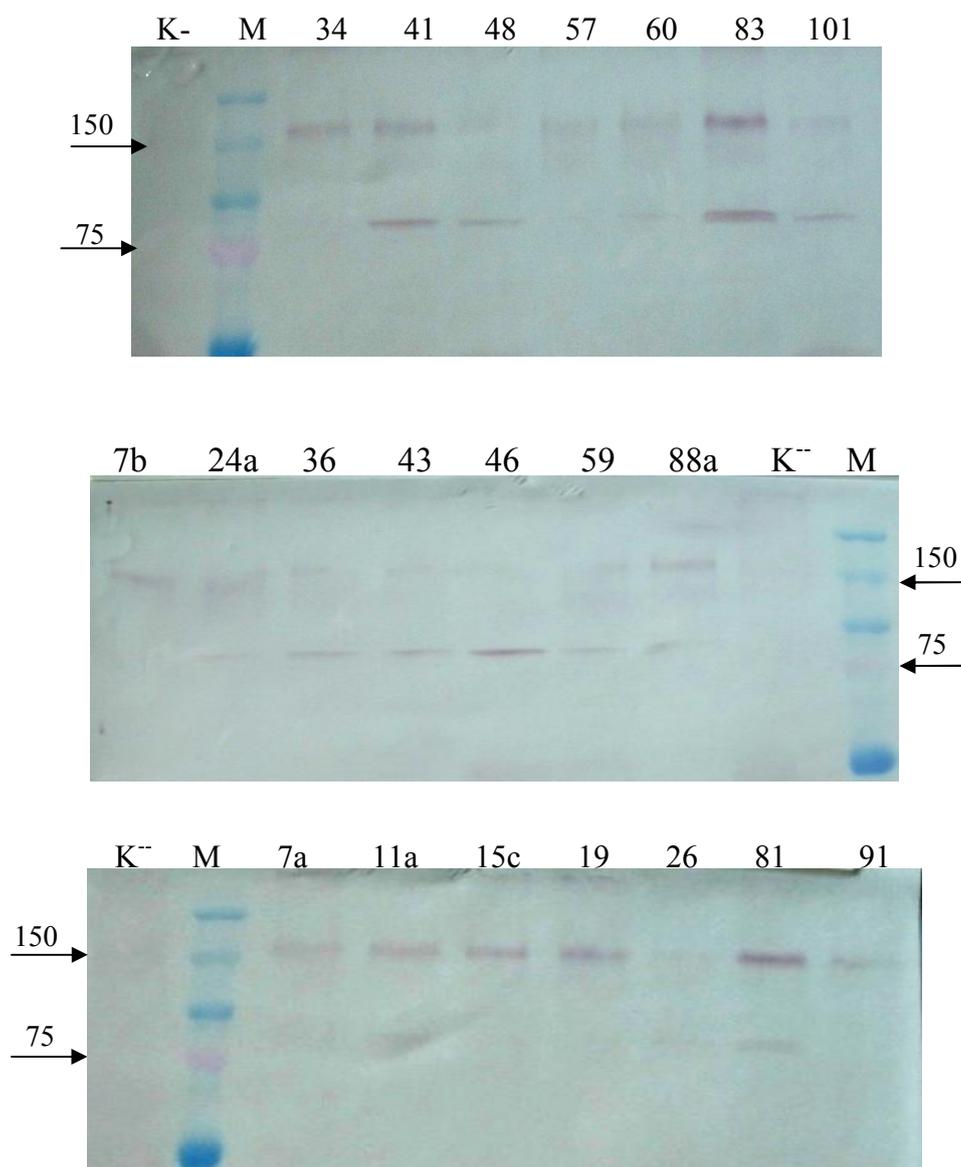


Рисунок 33 - Результат Вестерн-блот анализа трансгенных растений ряски, содержащих нуклеотидную последовательность RTB-M130, с использованием антител к пептиду M2e.

Детекцию проводили колориметрически с помощью хромогенного субстрата BCIP/NBT. Цифрами обозначены линии трансгенных растений, K⁻ - нетрансгенное растение ряски, M- маркеры молекулярной массы «BioRad», стрелками указаны маркеры 75 кДа, и 150 кДа. Ожидаемый размер слитого белка 42,2 кДа, димера - 84,4 кДа.

Таблица 14 - Обобщенный результат анализа экспрессии слитой последовательности RTB - M130 в трансгенных растениях ряски

| № линии | Общий белок (TSP), мг/г FW | Асиалофетуин-связанная ELISA, антитела к RTB | | Вестерн-блот анализ, антитела к M2e | |
|------------|----------------------------|--|-------------|-------------------------------------|---------|
| | | мкг RTB/ г FW | %RTB/TSP | 80 кДа | 160 кДа |
| 7a | 31,7 | 1,35 | 0,004 | - | + |
| 7b | 23,8 | 1,58 | 0,007 | - | + |
| 11a | 24,8 | 0,87 | 0,004 | + | + |
| 15c | 21,7 | 1,47 | 0,007 | - | + |
| 19 | 30,3 | 0.036 | 0,0001 | - | + |
| 24a | 20,5 | 0.046 | 0,0002 | + | + |
| 26 | 25,4 | 0,155 | 0,0006 | + | + |
| 34 | 19,9 | 0,511 | 0,003 | - | + |
| 36 | 19,1 | 0,675 | 0,006 | + | + |
| <i>41</i> | <i>19,2</i> | <i>1,717</i> | <i>0,01</i> | + | + |
| 42 | 30,9 | 1,544 | 0,005 | - | + |
| 43 | 18,6 | 0.054 | 0,0003 | + | + |
| <i>46</i> | <i>22,1</i> | <i>1,48</i> | <i>0,01</i> | + | - |
| 48 | 19,4 | 1,06 | 0,006 | + | + |
| 57 | 21,9 | 0,84 | 0,004 | - | + |
| 59 | 15,5 | 0,97 | 0,008 | + | + |
| 60 | 20,9 | 1,02 | 0,005 | + | + |
| <i>81</i> | <i>28,3</i> | <i>2,49</i> | <i>0,01</i> | + | + |
| <i>83</i> | <i>20,1</i> | <i>2,04</i> | <i>0,01</i> | + | + |
| 88a | 18,9 | 1,62 | 0,01 | + | + |
| 88b | 26,6 | 0,73 | 0,003 | - | + |
| 91 | 27,7 | 1,93 | 0,007 | - | + |
| <i>101</i> | <i>18,5</i> | <i>1,66</i> | <i>0,01</i> | + | + |
| табак sp14 | 20,5 | 2,4 | 0,01 | | |

TSP - тотальный (общий) растворимый белок; FW- сырой вес растения ряски; + положительная детекция; - отрицательная детекция; курсивом выделены линии трансгенных растений, отобранные для дальнейшей работы.

4 Заключение

Итогом проделанной работы стали следующие результаты:

- Показана экспрессия синтезированного нами 5'-концевого фрагмента гена M2 вируса гриппа птиц H5N1, включающего пептид M2e, с оптимизированным для растений кодонным составом в трансгенных растениях табака на уровне транскрипции.

- Показаны различия в синтезе N-концевых фрагментов белка M2 вируса гриппа птиц H5N1 разной длины в трансляционном слиянии с β -глюкуронидазой в трансгенных растениях табака. Так, синтез фрагмента в 43 а.о. в составе слитого белка M143- GUS наблюдался только в растениях *in vitro*, тогда как фрагменты длиной 30 а.о. (вариант M130, включающий фрагмент трансмембранного домена длиной 6 а.о.) и 22 а.о. (вариант M122, включающий только последовательность пептида M2e) в слиянии с β -глюкуронидазой стабильно синтезировались как *in vitro*, так и после длительного культивирования растений в теплице. Вероятно, это было связано с присутствием в варианте M143 полноразмерного трансмембранного гидрофобного домена PLVVAASIIIGILHLILWIL белка M2. Этот домен характеризуется высокой гидрофобностью, и, по-видимому, его присутствие может вести к распознаванию системой протеолиза растительной клетки слитого белка M143- β -глюкуронидаза в качестве дефектного. В отличие от последовательности M143, наличие фрагмента трансмембранного домена длиной 6 а.о. (PLVVAA) в варианте M130 не оказывало заметного влияния на уровень и стабильность экспрессии слитого белка M130- GUS в трансгенных растениях табака. Тем не менее, по морфологическим и ростовым характеристикам растения табака, трансформированные вектором pVIM143, как и растения трансформированные векторами pVIM122 и pVIM130, не отличались от контрольных нетрансформированных растений.

- Из местного сорта клещевины (*Ricinus communis*) была клонирована нуклеотидная последовательность субъединицы Б рицина (RTB), показана

идентичность её аминокислотной последовательности последовательностям, депонированным в базе данных GeneBank. Для использования в качестве перорального адъюванта, полученная последовательность RTB была клонирована в трансляционном слиянии с 5'-концом фрагмента M130 в растительном экспрессионном векторе.

- Впервые были получены трансгенные растения табака, стабильно экспрессирующие слитую последовательность RTB-M130. С помощью асиалофетуин - связывающей ELISA была показана корректность посттрансляционных модификаций субъединицы Б рицина в составе слитого белка RTB-M130. Количество синтезированного слитого белка RTB-M130 в отдельных линиях трансгенных растений табака достигало значений 1,5-2,5 мкг на грамм сырого веса, что в процентном отношении к общему растворимому белку составляло 0,01-0,02%.

- Была показана стабильная экспрессия слитых последовательностей M130 - β -глюкуронидаза и RTB-M130 в трансгенных растениях ряски. Была проведена количественная оценка содержания слитого белка M130- β -глюкуронидаза в препаратах трансгенных растений ряски методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием антител к β -глюкуронидазе. Накопление целевого белка M130- GUS в отдельных линиях трансгенных растений ряски достигало 0,5-0,9 мг на грамм сырого веса, что в процентном отношении к общему растворимому белку составляло до 2%. Анализ экспрессии слитой последовательности RTB-M130 в трансгенных растениях ряски, проведенный с помощью асиалофетуин - связывающей ELISA подтвердил корректность посттрансляционных модификаций субъединицы Б рицина в составе слитого белка. В отличие от рекомбинантного белка M130- GUS, количество синтезированного в трансгенных растениях ряски слитого белка RTB-M130, как и в трансгенных растениях табака, составляло порядка 1,5-2,5 мкг на грамм сырого веса, что может быть связано с особенностями экспрессии и метаболизма слитой последовательности субъединица Б рицина-M130.

5 Выводы работы

1. Показана стабильная экспрессия в трансгенных растениях пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансляционном слиянии с белком β -глюкуронидаза, уровень накопления слитого белка пептид М2е- β -глюкуронидаза в трансгенных растениях ряски малой составлял 0,5-0,9 мг/г сырого веса растений;
2. Показана стабильная экспрессия пептида М2е в трансляционном слиянии с клонированной нами из клещевины (*Ricinus communis*) субъединицей Б рицина в трансгенных растениях табака и ряски малой;
3. Показано сохранение способности рекомбинантного белка пептид М2е-субъединица Б рицина специфично связываться с гликопротеином асиалофетуином;
4. Проведённый количественный анализ экспрессии рекомбинантного белка пептид М2е-субъединица Б рицина, показал, что накопление слитой последовательности составляет до 1,5-2,5 мкг на грамм сырой массы независимо от вида растений.

6 Список использованной литературы

1. Иванова, И.Е. Таксономия семейства *Lemnaceae* S. Gray/ И.Е. Иванова // Ботанический журнал – 1973- Т. 58- С. 1413-1423.
2. Медуницын, Н.В. Вакцинология/ Н.В Медуницын.// Москва, 1999 -272 с.
3. Равин, Н.В. Продукция в растениях рекомбинантной противогриппозной вакцины на основе вирусоподобных НВс-частиц, несущих внеклеточный домен М2 - белка/ Равин Н.В., Котляров Р.Ю., Марданова Е.С., Куприянов В.В., Мигунов А.И., Степанова Л.А., Цыбалова Л.М., Киселев О.И., Скрябин К.Г. // Биохимия. – 2012 –Т. 77 (1) - С. 43-52.
4. Aguirreburualde, M. Efficacy of BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants/ Aguirreburualde M., Gómez M., Ostachuk A., Wolman F., Albanesi G., Pecora A., Odeon A., Ardila F., Escribano J.M., Dus Santos M., Wigdorovitz A. // Vet. Immunol. and Immunopathol.- 2013 -V.151 - P. 315–324.
5. Anaissie, E. Randomized comparison between antibiotics alone and antibiotics plus granulocyte macrophage colony stimulating factor (*E. coli* derived) in cancer patients with neutropenia/ Anaissie E., Vartivarian S., Bodey G.P. // Amer. J. Med. - 1996.- V. 100 - P. 17–23.
6. Andersson, C. Production and delivery of recombinant subunit vaccines/ C. Andersson // Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology (KTH) - Stockholm, Sweden, 2000.
7. Armitage, J. O. Emerging application of recombinant human granulocytemacrophage colony stimulating factor / J. O. Armitage // Blood – 1998 - V. 92 -P. 4491-4508.
8. Ashraf, S High level expression of surface glycoprotein of Rabies Virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. / Ashraf S., Singh P.K., Yadav D.K., Shahnawaz M., Mishra S., Sawant S.V., Tuli R.// J. Biotechnol.- 2005- V.119 - P.1–14.

9. Aviezer, D. A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme - a preclinical and phase I investigation/ Aviezer D., Brill-Almon E., Shaaltiel Y., Hashmueli S., Bartfeld D., Mizrachi S., Liberman, Y., Freeman A., Zimran A., Galun E. // PLoS One – 2009 - V.4(3).
10. Beerli R. Prophylactic and therapeutic activity of fully human monoclonal antibodies directed against Influenza A M2 protein/ Beerli R., Bauer M., Schmitz N., Buser R., Gwerder M., Muntwiler S., Renner W., Saudan P., Bachmann M. // Virology Journal – 2009 - V.6 (224).
11. Berinstein, A. Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle Disease Virus (NDV) transgenic plants as antigens/ Berinstein A., Vazquez-Rovere C., Asurmendi S., Gomez E., Zanetti F., Zabal O., Tozzini A., Grand D.C., Taboga O., Calamante G., Barrios H., Hopp E., Carrillo E. // Vaccine – 2005- V. 23 - P. 5583–5589.
12. Birch-Machin, I. Accumulation of Rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability/ Birch-Machin I., Newell C.A., Hibberd J.M., Gray J.C.// Plant Biotechnol J. – 2004 - V. 2 - P. 261–270.
13. Blanco, C. One step purification of *Escherichia coli* beta-glucuronidase/ Blanco C., Nemoz G. // Bioch. – 1987 - V. 69 - P.157-161.
14. Blome, M. C. Multivalent binding of ricin to bovine serum albumin-based neoglycoconjugates / Blome M. C., Schengrund C.-L. // Toxicon – 2008 - V.51(7) - P. 1214-1224.
15. Brodzik, R. Advances in Alfalfa Mosaic Virus-mediated expression of anthrax antigen in planta/ Brodzik R., Bandurska K., Deka D., Golovkin M., Koprowski H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005 - V. 338 - P.717–722.
16. Cady, S. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers/ Cady S., Schmidt-Rohr K., Wang J., Soto C., Degrado W., Hong M. // Nature – 2010 - V.463 (7281) - P.689-692.

17. Carter, J. E. Expression of a ricin toxin B subunit: insulin fusion protein in edible plant tissues/ Carter J. E., Odumosu O., Langridge W. H. R. // Mol. Biotechnol. – 2010- V. 44 - P. 90–100.
18. Chamberlain, K.L. Ricin B chain targeted to the endoplasmic reticulum of tobacco protoplasts is degraded by a CDC48- and vacuole-independent mechanism/ Chamberlain K.L., Marshall R. S., Jolliffe N. A., Frigerio L., Ceriotti A., Lord J. M., Roberts L.M.// The Journal of Biological Chemistry – 2008 - V.283 - P.33276-33286.
19. Chang, J.C. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant/ Chang J.C., Diveley J.P., Savary J.R., Jensen F.C. // Adv. Drug Deliv. Rev. – 1998 - V. 32 - P. 173-186.
20. Chiba, Y. Production of human compatible high mannose-type (Man5GlcNAc2) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*/ Chiba Y., Suzuki M., Yoshida S. //J. Biol. Chem. – 1998 - V.273(41) - P. 26298-263.
21. Chan, A. *Ricinus communis* cultivar Hale gcontig_1106430262706, whole genome shotgun sequence/ Chan A., Puiu D., Melake A., Orvis J., Zhao Q., Wortman J., Utterback T., Rosovitz M.J., Fraser C., Ravel J., Rabinowicz P // Direct Submission Submitted (06-JUL-2006, 2007, 2008), The Institute for Genomic Research, USA.
22. Chiba, K. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature-lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing/ Chiba K., Yanagawa Y., Masubuchi Y., Kataoka H., Kawaguchi T., Ohtsuki, M., Hoshino Y. // J. Immunol. – 1998 - V. 160 - P. 5037-5044.
23. Choi, N.W. Mucosal immunization with a ricin toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein stimulates a Th1 lymphocyte response/ Choi N.W., Estes M.K., Langridge W.H. // J. Biotechnol.- 2006a - V.121(2) - P.272-83.

24. Choi, N.W. Ricin toxin B subunit enhancement of rotavirus NSP4 immunogenicity in mice/ Choi N.W., Estes M.K., Langridge W.H. // *Viral Immunol.* - 2006b - V.19(1) - P.54-63.
25. Coste, A. Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea/ Coste A., Sirard J.C., Johansen K., Cohen J., Kraehenbuhl J.P. // *J. Virol.* - 2000 - V. 74 - P.8966-8971.
26. Cox, K. M. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*/ Cox K. M., Sterling J. D., Regan J. T., Gasdaska J. R., Frantz K. K., Peele C.G., Black, A., Passmore, D., Moldovan-Loomis, C., Srinivasan, M., Cuison,S., Cardarelli, P. M., Dickey, L. F. // *Nat. Biotechnol.* – 2006 - V. 24 - P. 1591–1597.
27. Cripps, K. J. M. Vaccines and mucosal immunization/ Cripps, K. J. M., Foxwell A.R. // *Vaccine* – 2001 - V. 19- P. 2513–2515.
28. Crombie, L. Synthesis of the algicidal allelochemical from *Lemna trisulca* (Duckweed)/ Crombie L., Heavers A.D. // *Chem. Soc. Percin Transact.* – 1992 - V. 10 - P. 2683-2687.
29. Cross, K.J. Mechanism of cell entry by influenza viruses/ Cross K.J., Burleigh L. M., Steinhauer D. A.// *Expert review in molecular medicine* – 2001 -V.3 - P. 1–18.
30. Dawson, R. M. Characterization of the asialofetuin microtitre plate-binding assay for evaluating inhibitors of ricin lectin activity/ Dawson R. M., Paddle B. M., Alderton M. R. // *J. Appl. Toxicol.* – 1999 - V.19 - P. 307–312.
31. Dawson, R. M. Monovalent and polyvalent carbohydrate inhibitors of ricin binding to a model of the cell-surface receptor/ Dawson R. M., Alderton M. R., Wells D., Hartley P. G. // *J. Appl. Toxicol.* – 2006 - V.26(3) - P. 247–252.
32. De Filette, M. Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs/ De Filette M., Joua W., Birkett A., Lyons K, Schultz B., Tonkyro A., Resch S., Fiers W. // *Virology* - 2005a - V. 337 - P. 149 – 161.

33. De Filette, M. The universal influenza vaccine M2e-HBc administered intranasally in combination with the adjuvant CTA1-DD provides complete protection/ De Filette M., Ramne A., Birkett A., Lycke N., Lowenadler B., W. Jou , X. Saelens, Fiers W.// *Vaccine* - 2005b.
34. De Filette, M. An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2/ De Filette M., Martens W., Roose K., Deroo T., Vervalle F., Bentahir M., . Vandekerckhove J, Fier W., Saelens X. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2008 - V. 283 - P. 11382–11387.
35. Demanji, A. Amino acid composition of leaf proteins extracted from some aquatic weeds/ A. Demanji. // *Agric. Food Chem.* – 1993 - V. 41 - P. 1232-1236.
36. Donayre-Torres, A.J. Production and purification of immunologically active core protein p24 from HIV-1 fused to ricin toxin B subunit in *E. coli* / Donayre-Torres A.J., Esquivel-Soto E., Gutiérrez-Xicoténcatl M.de L., Esquivel-Guadarrama F.R., Gómez-Lim M.A.// *Viol. J.* – 2009 - V. 6 - P. 6-17.
37. Dong, J.L. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against Rotavirus infection/ Dong J.L., Liang B.G., Jin Y.S., Zhang W.J., Wang T. // *Virology* – 2005 - V. 339 - P. 153–163.
38. Dus Santos, M.J. Development of transgenic alfalfa plants containing the Foot-and-Mouth-Disease Virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen/ Dus Santos M.J., Carrillo C., Ardila F., Rios R.D., Franzone P., Piccone M.E., Wigdorovitz A., Borca M.V. // *Vaccine* – 2005 - V. 23 - P.1838–1843.
39. Dus Santos, M.J. Transgenic plants for the production of veterinary vaccines/ Dus Santos M.J., Wigdorovitz A. // *Immunol. Cell Biol.* – 2005- V.83 - P. 229–238.
40. Ebrahimi, S. M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines/ Ebrahimi S. M., Tebianian M. // *Virus Genes* – 2011 - V. 42 - P.1–8.
41. Edelman, M. Transgenic *Lemnaceae*/ Edelman M., Per A., Flaishman M., Blumenthal A. // *International application published under the PCT* – 1998 - V.99(19498) - P. 1-56.

42. Feng, J. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2/ Feng J., Zhang M., Mozdzanowska K. // *Virology Journal* – 2006 - V.3(102).
43. Fiers, W. Soluble recombinant influenza vaccines/ Fiers W., Neiryneck S., Deroo T., Saelens X., Min Jou W // *The Royal Society* – 2001 - V.356 - P.1961-1963.
44. Fiers, W. M2e-based universal influenza A vaccine/ Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., Birkett A., Saelens X // *Vaccine* – 2009 - V.27 (45) - P. 6280-6283.
45. Fischer, R. Molecular farming of pharmaceutical proteins/ Fischer R., Emans N // *Transgenic Res.* – 2000 - V.9 (4-5) - P.279-99.
46. Fischer, R. Plant-based production of biopharmaceuticals/ Fischer R., Stoger E., Schillberg, P. Christou, R. M. Twyman// *Current Opinion in Plant Biology* – 2004 - V.7 -P. 152–158.
47. Frick, H. Callogenesis and carbohydrate utilization in *Lemna minor*/ H. Frick // *Plant Physiol.* – 1991 - V. 137 - P. 397-401.
48. Fulton, R. J. Purification of ricin A1, A2, and B chains and characterization of their toxicity/ Fulton R. J., Blakey D.C., Knowled P. P., Uhr J. W., Thorpeq P. E., Vitetta E. S.// *The Journal of Biological Chemistry* – 1986 - V. 261(12) - P. 5314-5319.
49. Gasdaska, J.R. Advantages of therapeutic protein production in the aquatic plant *Lemna*/ Gasdaska J.R., Spencer D., L. Dickey // *Bio Processing Journal* - 2003.
50. Gerhard, W. Prospects for universal influenza virus vaccine/ Gerhard W., Mozdzanowska K., D. Zharikova // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006 - V.12(4) - P.569–574.
51. Giddings, G. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals/ Giddings G., Allison G., Brooks D., A. Carter // *Nat. Biotechnol.* – 2000 - V. 18(11) - P.1151-5.

52. Glenn, G.M. Toxin-mediated effects on the innate mucosal defenses: implications for enteric vaccines/ Glenn G.M., Francis D.H., E.M. Danielsen // *Infect Immun.* - 2009 –V.77(12) – P.5206-15.
53. Gould-Fogerite, S. Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines/ Gould-Fogerite S., Kheiri M.T., Zhang F., Wang Z., Scolpino A.J., Feketeova E., Canki M., R.J. Mannino // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 1998 - V.32 - P. 273-287.
54. Goopy, J.P. A review in the role of duckweed in nutrient reclamation and as a source of animal feed/ Goopy J.P., P.J. Murray // *Asian Austral Journal Ani Sci.* – 2003 - V. 16 - P. 297-305.
55. Graham-Rowe, D. Racing against the flu/ D. Graham-Rowe // *Nature* – 2011 - V. 480 - P. S2–S3.
56. Gregoriadis, G. Vaccine entrapment in liposomes/ Gregoriadis G., McCormack B., Obrenovic M., Saffie R., Zadi B., Y. Perrie // *Methods* – 1999 - V.19 - P.156-162.
57. Gregory, C.D. Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis/ Gregory C.D., Dive C., Henderson S., Smith C.A., Williams G.T., Gordon J., A.B. Rickinson // *Nature* – 1991 - V. 349 - P.612-614.
58. Guerrero-Andrade, O. Expression of the Newcastle Disease Virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies/ Guerrero-Andrade O., Loza-Rubio E., Olivera-Flores T., Feher-vari-Bone T., M.A. Gomez-Lim // *Transgenic Res.* – 2006 - V. 15 -P.455–463.
59. Gupta, R.K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants/ R.K. Gupta// *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 1998 - V.32 - P. 155-172.
60. Gupta, R.K. Latent Membrane Protein 1 as a molecular adjuvant for single-cycle lentiviral vaccines/ Gupta R.K., Termini, Niu, Kanagavelu, Rahmberg, Kornbluth, Evans, Stone // *Retrovirology* – 2001 -V. 8 - P.39.

61. Halling, K.C. Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*/ Halling K.C., Halling A.C., Murray E.E., Ladin B.F., Houston L.L., R.F. Weaver// *Nucleic Acids Res.* – 1985 - V.13 (22) – P..8019-8033.
62. Hatfield, G.W. Optimizing scale up yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and translation engineering/ Hatfield G.W., D.A. Roth // *Biotechnol. Annu. Rev.* – 2007 - V.13 - P.27-42.
63. Haustein, A.T. Performance of broiler chickens fed diets containing duckweed (*Lemna gibba*)/ Haustein A.T., Gilmar R.N., P.W. Skillicorn // *Agric. Sci.* – 1994 - V. 122 - P. 285-289.
64. He, Z. Pharmaceutical proteins produced in plant bioreactor in recent years/ He Z., Du X., Yao Wei., J. Dai // *African Journal of Biotechnology* – 2008 - V. 7 (25) - P. 4917-4925.
65. Henderson, S. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death/ Henderson S., Rowe M., Gregory C., Croom-Carter D., Wang F., Longnecker R., Kieff E., A. Rickinson // *Cell* – 1991 - V.65 - P.1107-1115.
66. Hillman, W.S. The uses of duckweed/ Hillman W.S., D.D. Culley// *Am. Sci.* – 1978 - V. 66 – P. 442-451.
67. Holmgren, J. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA/ Holmgren J., Adamsson J., Anjuère F., Clemens J., Czerkinsky C., Eriksson K., Flach C.F., George-Chandy A., Harandi A.M., Lebens M., Lehner T., Lindblad M., Nygren E., Raghavan S., Sanchez J., Stanford M., Sun J.B., Svennerholm A.M., S. Tengvall // *Immunol Lett.* – 2005 - V.97(2) - P.181-188.
68. Holst, R.W. Pesticide assessment guidelines, subdivision hazard evaluation: nontransget plants/ Holst R.W., Ellwanger T.C. - EPA – 540/9-82-020 - Washington D.C: Government Printing Office - 1982.

69. Hood, E. Commercial production of Avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification/ Hood E., Witcher D., Maddock S., Meyer T., Baszczynski C., M. Bailey // Mol. Breed. – 1997 - V. 3 - P. 291–306.
70. Horsch, R.B. A simple and general method for transferring genes into plants/ Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N., Wallroth M., Eichholtz D., Rogers S.G., R.T. Fraley // Science – 1985 - V.227 (4691) - P. 1229-1231.
71. Huang, Y. Production of *FaeG*, the major subunit of K88 fimbriae, in transgenic tobacco plants and its immunogenicity in mice/ Huang Y., Liang W., Pan A., Zhou Z., Huang C., Chen J., D. Zhang // Infect. Immun. – 2003 - V.71 -, P.5436–5439.
72. Huang, Y. Immunogenicity of the epitope of the Foot-and-Mouth-Disease Virus fused with a hepatitis B core protein as expressed in transgenic tobacco/ Huang Y., Liang W., Wang Y., Zhou Z., Pan A., Yang X., Huang C., Chen J., D. Zhang // Viral Immunol. – 2005 - V. 18 - P.668–677.
73. Jefferson, R. A. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants/ Jefferson R. A., Kavanagh' T. A., M. W. Bevan // The EMBO Journal – 1987 - V.6 (13) -P.3901 -3907.
74. Jelaska, S. Production of biopharmaceuticals, antibodies and edible vaccines in transgenic plants/ Jelaska S., Mihaljević S., N. Bauer// Current Studies of Biotechnology - Immuno-Modulatory Drugs. – 2005 - V.4 - P. 121-127.
75. Jenner, H.A. Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity of coal residues and polluted sediments/ Jenner H.A., M.J. Janssen // Archives Environ. Contam. Tox. – 1993 - V. 25 -P. 3-11.
76. Joensuu, J.J. Gly-cosylated F4 (K88) fimbrial adhesin *FaeG* expressed in barley endosperm induces ETEC-neutralizing antibodies in mice/ Joensuu J.J., Kotiaho M., Teeri T.H., Valmu L., Nuutila A.M., Oksman-Caldentey K.M., V. Niklander-Teeri // Transgenic Res. - 2006a - V. 15 - P.359–373.

77. Joensuu, J.J. F4(K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in alfalfa reduces F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* excretion in weaned piglets/ Joensuu J.J., Verdonck F., Ehrstrom A., Peltola M., Siljander-Rasi H., Nuutila A.M., Oksman-Caldentey K.M., Teeri T.H., Cox E., Goddeeris B.M., V. Niklander-Teeri // Vaccine - 2006b - V. 24 - P.2387–2394.
78. Kaihara, S. A flower-induction substance derived from norepinephrine upon contact with intact *Lemna* plants/ Kaihara S., A. Takimoto // Plant Cell Physiol. – 1991 - V 32 - P. 1107-1109.
79. Kapusta, J. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus/ Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., Pniewski T., Letellier M., Lisowa O., Yusibov V., Koprowski H., Plucienniczak, A., A. B. Legocki // FASEB J. – 1999 - V. 13 - P. 1796–1799.
80. Kang, T.J. Mass production of somatic embryos expressing *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in *Siberian ginseng*/ Kang T.J., Lee W.S., Choi E.G., Kim J.W., Kim B.G., M.S. Yang// J. Biotechnol.- 2006 - V. 121 - P.124–133.
81. Kang, T.J. Enhanced expression of B-subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence/ Kang T.J., Han S.C., Jang M.O., Kang K.H., Jang Y.S., M.S. Yang // Appl. Biochem. Biotechnol. - 2004 - V. 117 - P.175–187.
82. Khandelwal, A. Expression of hemagglutinin protein of Rinderpest Virus in transgenic tobacco and immunogenicity of plant-derived protein in a mouse model/ Khandelwal A., Lakshmi S.G., M.S. Shaila // Virology – 2003 - V. 308 - P.207–215.
83. Khandelwal, A. Systemic and oral immunogenicity of hemagglutinin protein of Rinderpest Virus expressed by transgenic peanut plants in a mouse model/ Khandelwal A., Renukaradhya G.J., Rajasekhar M., Sita G.L., M.S. Shaila // Virology – 2004 - V. 323 - P.284–291.

84. Kiani, S. *Ricinus communis* cultivar RB816 ricin B-chain gene/ Kiani S., Husnain T. - National Center of Excellence in Molecular Biology, Punjab University, Pakistan - Submitted (02-FEB-2012).
85. Kim, T.G. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*)/ Kim T.G., Kim M.Y., Kim B.G., Kang T.J., Kim Y.S., Jang Y.S., Arntzen C.J., M.S. Yang // Protein Expr. Purif. – 2007 - V. 51 - P.22–27.
86. Kohl, T. Plant-produced Cottontail Rabbit Papillomavirus L1 protein protects against tumor challenge: a proof-of-concept study/ Kohl T., Hitzeroth Q., Stewart D., Varsani A., Govan V.A., Christensen N.D., Williamson A.L., E.P. Rybicki // Clin. Vaccine Immunol. – 2006 - V. 13 - P.845–853.
87. Korban, S. Targeting and expression of antigenic proteins in transgenic plants for production of edible oral vaccines/ S. Korban // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant – 2002 - V. 38 - P. 231–236.
88. Koya, V. Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge/ Koya V., Moayeri M., Leppla S.H., H. Daniell // Infect. Immun. – 2005 - V. 73 - P.8266–8274.
89. Knipe, D.M. Fields virology, 5-th edition/ Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., M.A. Martin - Lippincott Williams & Wilkins – 2006 - P. 3177.
90. Kurtz, S. Growth impairment resulting from expression of influenza virus M2 protein in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a novel inhibitor of influenza virus/ Kurtz S., Luo G., Hahnenberger K., Brooks C., Gecha O., Ingalls K., Numata K-I., M. Krystal // Antimicrobial Agents and Chemotherapy – 1995 - V. 39 (10) - P. 2204–2209.
91. Lamb, R. A. Identification of a second protein (M₂) encoded by RNA segment 7 of influenza virus/ Lamb R. A., P.W. Choppin // Virology – 1981 - V. 112 (2) - P. 729–737.

92. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4/ U.K. Laemmli // *Nature*. - 1970. - V.227(5259) - P. 680-685.
93. Landolt, E. Anatomy of the *Lemnaceae* (duckweeds). Extreme adaptations in angiospermous hydrophytes/ E. Landolt - Berlin, Gebruder Borntraeger - 1998.
94. Landolt E. The family of *Lemnaceae* – a monographic stud., Vol.1. / E Landolt - Veroff Geobot Inst ETH - Stiftung Rubel, Zurich - 1986.
95. Landolt, E. The Family of *Lemnaceae* – a Monographic Study. Vol.2 Byosystematic Investigations in Family of Duckweeds (*Lemnaceae*)./ Landolt E. and Kandeler R. - Zurich, Veroffentlichungen des Geobotanischen Institutes ETH - Stiftung Rubel - 1987.
96. Layton, S. Vaccination of chickens with recombinant *Salmonella* expressing M2e and CDI 54 epitopes increases protection and decreases viral shedding after low pathogenic avian influenza challenge/ Layton S., Kapczynski D., Higgins S., Higgins J., Wolfenden A., Liljehjelke K., Bottje W., Swayne D., Berghmanj L., Kwon Y., Hargis B., K. Cole // *Poultry Science* – 2009 - V. 88 - P.2244-2252.
97. Lee, J.Y. Plant-synthesized *E. coli* CFA/I fimbrial protein protects Caco-2 cells from bacterial attachment/ Lee J.Y., Yu J., Henderson D., W.H. Langridge // *Vaccine* – 2004 - V. 23 - P.222–231.
98. Legocki, A.B. Immunoprotective properties of transgenic plants expressing E2 glycoprotein from CSFV and cysteine protease from *Fasciola hepatica*/ Legocki A.B., Miedzinska K., Czaplinska M., Plucieniczak A., H. Wedrychowicz// *Vaccine* – 2005- V. 23, P.1844–1846.
99. Lentz, E.M. VP8 antigen produced in tobacco transplastomic plants confers protection against bovine rotavirus infection in a suckling mouse model/ Lentz E.M., Mozgovej M.V., Bellido D., Dus Santos M.J., Wigdorovitz A., Bravo-Almonacid F.F. // *J. Biotechnol.* – 2011 - V. 156(2) - P.100-107.

100. Li, J.T. Immunogenicity of a plant-derived edible Rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations/ Li J.T., Fei L., Mou Z.R., Wei J., Tang Y., He H.Y., Wang L., Y.Z. Wu // *Virology* - 2006 - V. 356 - P.171–178.
101. Lin, Y. The use of synthetic genes for the expression of ciliate proteins in heterologous systems/ Lin Y., Cheng G., Wang X., T.G. Clark // *Gene* – 2002 - V.288 (1-2) - P.85-94.
102. Liu, W. N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication/ Liu W., Li H., Y. Chen // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2003 - V.35 - P.141– 146.
103. Liu, W. Immunomodulatory activity of recombinant ricin toxin binding subunit B (RTB)/ Liu W., Na Xu, Yuan H., Songyan Li, Liu L., Pu Z., Wan J., Wang H., Chang Y., R. Li // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013 - V.14 - P.12401-12410.
104. Loza-Rubio, E. Development of an edible rabies vaccine in maize using the Vnukovo strain/ Loza-Rubio E., Rojas E., Gómez L., Olivera M.T., M.A. Gómez-Lim // *Dev. Biol. Basel.*- 2008 - V.131, P.477-482.
105. Ma, Ch. Identification of the functional core of the influenza A virus A. M2 proton-selective ion channel/ Ma Ch., Polishchuk A., Ohigashia Yu., Stoufferb A., Schön A., E. Magavern // *PNAS* – 2009 - V.106 - P.12283–12288.
106. Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*/ Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.- Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory - 1982.
107. Marconi, G. In planta production of two peptides of the Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of Potato Virus X/ Marconi G., Albertini E., Barone P., De Marchis F., Lico C., Marusic C., Rutili D., Veronesi F., A. Porceddu // *BMC Biotechnol.* – 2006 - V. 6 - P.29.
108. Martin-Alonso, J.M. Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing Rabbit Hemorrhagic Disease Virus capsid protein/ Martin-Alonso J.M., Castanon S., Alonso P., Parra F., R. Ordas // *Transgenic Res.* – 2003 - V. 12 - P.127–130.

109. Marti'nez. Exploring different strategies to express Dengue virus envelope protein in a plant system/ Marti'nez, Topal, Giulietti, Julia'n Rodr'iguez Talou, Hugh Mason// *Biotechnol. Lett.* – 2010 - V. 32 - P.867–875.
110. Mason, H.S. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine/ Mason H.S., Warzecha H., Mor T., C.J. Arntzen // *Trends Mol. Med.* – 2002 - V. 8 - P. 324–329.
111. Matsuo, K. Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin)/ Matsuo K., Yoshikawa T., Asanuma H., Iwasaki T., Hagiwara Y., Chen Z., Kadowaki S.E., Tsujimoto H., Kurata T., S.I. Tamura // *Vaccine* – 2000 - V. 18 - P. 2713-2722.
112. Mahrous, A.A. *Ricinus communis* ricin B chain gene. / Mahrous A.A., El-Abd E.A., Helmy M., Haroun M - Department of Biotechnology, Insti Postgraduate Studies and Research, Egypt. - Direct Submission Submitted (09-OCT-2009).
113. McCullough, C. Characterization of influenza hemagglutinin interactions with receptor by NMR/ McCullough C., Wang M., Rong L., M. Caffrey // *PLoS ONE* – 2012 - V. 7(7).
114. Medina-Bolivar, F. A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines/ Medina-Bolivar F., Wright R., Funk V., Sentz D., Barroso L., Wilkins T.D., Petri W. J., C.L. Cramer // *Vaccine* – 2003 - V.21 - P.997-1005.
115. Mesmar, M.N. The antibiotic activity of some aquatic plants and algae extract from Jordan/ Mesmar M.N., M. Abussaud // *Qatar Univ. Sci. Bull.* – 1991 -V. 11, P. 155-160.
116. Molina, A. High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts/ Molina A., Hervas-Stubbs S., Daniell H., Mingo-Castel A.M., J. Veramendi // *Plant Biotechnol. J.*- 2004 - V. 2 - P.141–153.
117. Molina, A. Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from Canine Parvovirus/ Molina A., Veramendi J., S. Hervas-Stubbs // *Virology*- 2005- V. 342 - P.266–275.

118. Moon, H.K. Effects of medium components and light on callus induction, growth and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed)/ H.K. Moon, A.M. Stomp // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*- 1997 - V. 30 - P. 20-25.
119. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures/ T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant* – 1962 - V. 15 - P. 473-496.
120. Neumann, G. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties/ Neumann G., H. Chen, G. F. Gao, Y. Shu, Y. Kawaoka // *Cell Research* – 2010 - V. 20 - P.51-61.
121. Neutra, M.R. Mucosal vaccines: the promise and the challenge/ M.R. Neutra, P. Kozlowski // *Nat. Rev. Immunol.* -2006 -V. 6 - P. 148–158.
122. Nicholson, K.G. Influenza/ Nicholson K.G., Wood J.M., M. Zambon // *Lancet* – 2003 - V. 362 - P. 1733 –1745.
123. Nykiforuk, C.L. Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds/ Nykiforuk C.L., Boothe J.G., Murray E.W., Keon R.G., Goren H.J., Markley N.A., M.M. Moloney // *Plant Biotechnol. J.* – 2006 - V.4(1) - P.77-85.
124. O'Hagan, D.T. Poly (lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines/ O'Hagan D.T., Singh M., R.K Gupta // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 1998 - V. 32 - P. 225-246.
125. Park, E. The M2 ectodomain is important for its incorporation into influenza A virions/ Park E., Castrucci M., Portner A., Y. Kawaoka // *J. Virology.* – 1998 - V.72 - P.2449-2455.
126. Paul, M. Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms/ M. Paul, J. K-C.Ma // *Biotechnology and Applied Biochemistry* – 2011 - V. 58 (1) - P.58–67.
127. Perea Arango, I. Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high-levels and evaluation of immune responses in mice/ Perea Arango I., Loza Rubio E., Rojas Anaya E., Olivera Flores T., Gonzalez de la Vara L., M.A. Gómez Lim // *Plant Cell Rep.* – 2008 - V.27(4) - P.677-685.

128. Pe´rez Filgueira, D.M. Bovine Herpes Virus gD protein produced in plants using a recombinant Tobacco Mosaic Virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity/ Pe´rez Filgueira D.M., Zamorano P.I., Dominguez M.G., Taboga O., Zajac M.P.D., Puntel M., Romera S.A., Morris T.J., Borca M.V., A.M. Sadir// Vaccine – 2003 -V.21 - P. 4201–4209.
129. Pe´rez Filgueira, D.M. Passive protection to Bovine Rotavirus (BRV) infection induced by a BRV VP8* produced in plants using a TMV-based vector/ Pe´rez Filgueira D.M., Mozgovej M., Wigdorovitz A., Santos M.J.D., Parreno V., Trono K., Fernandez F.M., Carrillo C., Babiuk L.A., Morris T.J., M.V. Borca // Arch. Virol. – 2004 - V. 149 - P.2337–2348.
130. Pielak, R. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel/ Pielak R., Schnellc J., J. Choua // PNAS – 2009 - V.106(18) - P.7379–7384.
131. Piller, K.J. Expression and immunogenicity of an *Escherichia coli* K99 fimbriae subunit antigen in soy-bean/ Piller K.J., Clemente T.E., Jun S.M., Petty C.C., Sato S., Pascual D.W., K.L. Bost // Planta – 2005 -V. 222 -, P.6–18.
132. «Plant-Produced Microbial Vaccines»./ Current Topics in Microbiology and Immunology ed. by A. Karasev - Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
133. Plotkin, J. Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus/ J. Plotkin, J. Dushoff // PNAS – 2003 - V.100(12) - P.7152-7157.
134. Porath, D. Duckweeds as an aquatic crop: evaluation of clones for aquaculture/ Porath D., Hopher B., A. Koton //Aquat. Bot. – 1979 - V.7 - P. 273-278.
135. Rigano, M.M. Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana* / Rigano M.M., Alvarez M.L., Pinkhasov J., Jin Y., Sala F., Arntzen C.J. A.M. Walmsley // Plant Cell Rep. – 2004 - V. 22 - P.502–508.

136. Rolfe, S.A. Deletion analysis of a phytochrome-regulated monocot rbcS promoter in a transient assay system/ S.A Rolfe., E.M. Tobin // PNAS – 1991 - V.88 (7) - P. 2683-2686.
137. Rybicki, E. Plant-made vaccines for humans and animals/ E. Rybicki// Plant Biotechnology Journal – 2010 - V. 8 - P. 620–637.
138. Saldana, S. Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies/ Saldana S., Guadarrama F.E., Flores T.D.O., Arias N., Lopez S., Arias C., Ruiz-Medrano R., Mason H., Mor T., Richter L., Arntzen C.J., M.A.G. Lim// Viral Immunol. – 2006 -V. 19 - P.42–53.
139. Salom, D. pH-dependent tetramerization and amantadine binding of the transmembrane helix of M2 from the influenza A virus/ Salom D, Hill B.R., Lear J.D., W.F. DeGrado // Biochemistry – 2000 - V. 39 – P. 14160–14170.
140. Santi, L. Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system/ Santi L., Giritch A., Roy C.J., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y., Webb R., Arntzen C.J., H.S. Mason //PNAS – 2006- V.103 (4) - P.861-866.
141. Schnell, J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus/ Schnell J., J. Chou // Nature – 2008 - V. 451(7178) - P. 591–595.
142. Shaaltiel, Y. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system/ Shaaltiel Y., Bartfeld D., Hashmueli S., Baum G., Brill-Almon E., Galili G., Dym O., Boldin-Adamsky S. A., Silman I., Sussman J. L., Futerman A. H., D. Aviezer // Plant Biotechnol. J. – 2007 - V. 5 - P.579–590.
143. Shchelkunov, S. Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses/ Shchelkunov S., Salyaev R., Pozdnyakov S., Rekoslavskaya N., Nesterov A., Ryzhova T., Sumtsova V., Pakova N., Mishutina U., Kopytina T., R.W. Hammond // Biotechnol. Lett. – 2006 - V. 28 - P.959–967.

144. Schmidt, T.G.M. One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep-tag" and immobilized recombinant core streptavidin/ Schmidt T.G.M., A Skerra // *J. Chromatogr.* – 1994 - V. 676 - P. 337–345.
145. Schlütter, J. Vaccine for all seasons / J. Schlütter // *Nature* – 2011 - V. 480 - P. S6–S8.
146. Schotsaert, M. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments/ Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., X. Saelens // *Expert. Rev. Vaccines* – 2009 - V. 8(4) - P. 499–508.
147. Shim, B.-S. Sublingual immunization with M2-based vaccine induces broad protective immunity against influenza/ Shim B.-S., Yю Choi, C.-H. Yun, E.-G. Lee, Y. Jeon, S.-M.Park, I. Cheon, D.-H. Joo, Ch. Cho, M.-S. Song, S.-U. Seo, Y.-H. Byun, H. Park, H. Poo, B. Seong, J. Kim, H. Nguyen, K. Stadler, D. Kim, K.-J. Hong, C. Czerkinsky, M. Song // *PLoS ONE* – 2011 - V. 6 (11) – P. e27953.
148. Singh, M. Advances in vaccine adjuvants/ M. Singh, D. O'Hagan // *Nat. Biotechnol.* -1999 - V. 17 - P.1075-1081
149. Smith, M.J. Structural characterization of plant-derived hepatitis B surface antigen employed in oral immunization studies/ Smith M.J., Richter L., Arntzen C.J., Shuler M.L., H.S. Mason // *Vaccine* – 2003 - V. 21 P.4011–4021.
150. Sphyris, N. Mutational analysis of the ricinus lectin B-chains. Galactose-binding ability of the 2 gamma subdomain of *Ricinus communis* agglutinin B-chain/ Sphyris N., Lord J.M., Wales R., L.M. Roberts // *J. Biol. Chem.* – 1995 - V.270(35) - P.20292-20297.
151. Stallknecht, E.D. Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc/ E.D. Stallknecht // *Proc. 4th International Symp. on Avian Influenza, Athens, USA* - May 29-31, 1997 - P. 61-67.

152. Stoger, E. Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems/ Stoger E., Sack M., Perrin Y., Vaquero C., Torres E., Twyman R.M., Christou P., R. Fischer // Mol. Breed. – 2000 - V. 9 - P.149-158.
153. Stomp, A.M. Genetically engineered duckweed/ Stomp A.M., Rajbhandari N. - US Patent № 6,040,789. - 1998.
154. Stomp, A.M. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. In Vitro Cellular & Developmental Biology/ A.M. Stomp // Plant – 2001 - V.37 (3) - P. 349-353.
155. Stomp, A.M. The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing/ A.M. Stomp // Biotechnol. Annu. Rev. – 2005 - V.11 - P. 69-99.
156. Sun, Y. Expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627/ Sun Y., Cheng J.J., Himmel M.E., Skory C.D., Adney W.S., Thomas S.R., Tisserat B., Nishimura Y., Y.T. Yamamoto // Bioresour. Technol. – 2007 - V.98 (15) - P. 2866-2872.
157. Tacket, C.O. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes/ Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G., Estes M.K., Levine M.M., C. J. Arntzen// J. Infect. Dis. – 2000 - V. 182 - P. 302–305.
158. Takahashi, I. New horizon of mucosal immunity and vaccines/ Takahashi I., Nochi T., Yuki Y., H. Kiyono // Curr. Opin. Immunol. – 2009 - V. 21 - P. 352–358.
159. Tamura, S. Synergistic action of cholera toxin B subunit (and *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine /Tamura S., Yamanaka A., Shimohara M., Tomita T., Komase K., Tsuda Y., Suzuki Y., Nagamine T., Kawahara K., H. Danbara // Vaccine – 1994 - V.12(5) - P.419-426.
160. Tamura, S.I. A proposal for safety standards for human use of cholera toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) derivatives as an adjuvant of nasal inactivated influenza vaccine/ S.I. Tamura, Kurata // Jpn. J. Infect. Dis. – 2000 - V.53 (3) - P.98-106.

161. Thanavala, Y. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B/ Thanavala Y., Mahoney M., Pal S., Scott A., Richter L., Natarajan N., Goodwin P., Arntzen C. J., H. S. Mason// PNAS – 2005 - V. 102 -P. 3378–3382.
162. Thanavala, Y. Plant-derived vaccines: a look back at the highlights and a view to the challenges on the road ahead/ Thanavala Y., Huang Z., H.S. Mason// Expert. Rev. Vaccin. – 2006 - V.5(2) - P.249 –260.
163. Tinker, J.K. Purification and characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* LcrV-cholera toxin A(2)/B chimeras/ Tinker J.K., Davis C.T., B.M. Arlian // Protein Expr. Purif. – 2010 - V.74(1) - P.16-23.
164. Tokuhara, D. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection/ Tokuhara D., Beatriz plvarez, Mejima M., Tomoko Hiroiwa, Yuko Takahashi, Shiho Kurokawa, Masaharu Kuroda, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Tomonori Nochi, Hiroshi Sagara, Farah Aladin, Marcotte H., Frenken L. G.J., Iturriza-Gómara M., Hiroshi Kiyono, Hammarström L., Yoshikazu Yuki// J. Clin. Invest. – 2013 -V. 123(9) - P. 3829–3838.
165. Tregear, J.W. The lectin gene family of *Ricinus communis*: cloning of a functional ricin gene and three lectin pseudogenes/ Tregear J.W., L.M. Roberts // Plant Mol. Biol. - 1992 - V.18 (3) - pp. 515-525.
166. Twyman, R. M. Molecular farming in plants: host systems and expression technology/ Twyman R. M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., R. Fischer// Trends in Biotechnology – 2003 - V. 21(12) - P. 570-578.
167. Twyman, R. M. Transgenic plants in the biopharmaceutical market/ Twyman R. M, Schillberg S., R. Fischer // Expert. Opin. Emerging Drugs – 2005 - V. 10(1).
168. Valenzuela, P. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast/ Valenzuela P., Medina A., Rutter W.J., Ammerer G., B.D. Hall // Nature – 1982 - V.298 - P. 347–350.

169. Verweij, W.R. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen/ Verweij W.R., de Haan L., Holtrop M., Agsteribbe E., Brands R., van Scharrenburg G.J., J. Wilschut // Vaccine – 1998 - V.16(20) - P.2069-2076.
170. Wagner, R. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections/ Wagner R., Matrosovich M., H.D. Klenk// Rev. Med. Virol. – 2002 - V.12(3) - p.159-66.
171. Wagner, B. Expression of the B subunit of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* in tobacco mosaic virus-infected *Nicotiana benthamiana* plants and its characterization as mucosal immunogen and adjuvant/ Wagner B., Hufnagl K., Radauer C., Wagner S., Baier K., Scheiner O., Wiedermann U., Breiteneder H// J. Immunol Methods. – 2004 - V. 287(1-2) - P.203-215.
172. Wang, R. Therapeutic potential of a fully human monoclonal antibody against influenza A virus M2 protein/ Wang R., Song A., Levin J // Antiviral Research. – 2008 - V.80(2) - P.168-177.
173. Webster, R.G. Influenza: an emerging disease/ R.G. Webster // Emerging Infectious Diseases – 1998 - V. 4(3) - P.436-441.
174. Weeks, A. Population-level variation of the preprorocin gene contradicts expectation of neutral equilibrium for generalist plant defense toxins/ Weeks A., Leshin J.A., Dretchen K.L., Skowronski E.W., K.P. O'Connell // Toxicon – 2010 - V.55 (8) - P.1475-1483.
175. Wigdorovitz, A. Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to Bovine Rotavirus produced in transgenic plants/ Wigdorovitz A., Mozgovoij M., Santos M.J.D., Parreno V., Gomez C., Perez-Filgueira D.M., Trono K.G., Rios R.D., Franzone P.M., Fernandez F., Carillo C., Babiuk L.A., Escribano J.M., M.V. Borca// J. Gen. Virol. -2004 - V. 85 - P.1825–1832.

176. Witcher, D. Commercial production of β -glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants/ Witcher D., Hood E., Peterson D., Bailey M., Marchall L., Bond D// Mol. Breeding – 1998 - V. 4 - P. 301–312.
177. Whittaker, G. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine/ G. Whittaker // Expert Rev. Mol. Med. – 2001 - V.8 - P.1-13.
178. Woffenden, B. J. Expression of a ricin B: F1:V fusion protein in tobacco hairy roots: steps toward a novel pneumonic plague vaccine/ Woffenden B. J., Ñopo L. H., Cramer C. L., Dolan M. C., F. Medina-Bolivar // Electronic Journal of Integrative Biosciences – 2008 - V.3 (1) - P.10-19.
179. Wolf, A. Vaccination with M2e-based multiple antigenic peptides: characterization of the B cell response and protection efficacy in inbred and outbred mice/ Wolf A., Mozdzanowska K., Williams K. L., Singer D., Richter M., Hoffmann R., Caton A. J., Otvos L., Erikson J // PLoS ONE – 2011 - V. 6(12) - P. 28445.
180. Wu, Y.Z. Oral immunization with Rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA/ Wu Y.Z., Li J.T., Mou Z.R., Fei L., Ni B., Geng M., Jia Z.C., ZhouW., Zou L.Y., Tang Y. // Virology – 2003 - V. 313 - P.337–342.
181. Wu, H. Expression of immunogenic VP2 protein of Infectious Bursal Disease Virus in *Arabidopsis thaliana* / Wu H., Singh N.K., Locy R.D., Scissum-Gunn K , J J. Giambrone // Biotechnol. Lett. - 2004a - V. 26 - P.787–792.
182. Wu, H. Immunization of chickens with VP2 protein of Infectious Bursal Disease Virus expressed in *Arabidopsis thaliana*./ Wu H., Singh N.K., Locy R.D., Scissum-Gunn K., J.J. Giambrone // Avian Dis. - 2004b - V. 48 - P.663–668.
183. Wu, F. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus/ Wu F., Huang J., Yuan X., Huang W., Y. Chen // Vaccine – 2007 - V.25(52) - p.8868-8873.

184. Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells/ F.M. Wurm // Nat. Biotechnol. – 2004 - V. 22(11) - P.1393-1398.
185. Yang, D. Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice/ Yang, D., Guo, F., Liu, B., Huang, N., S. C. Watkins // Planta -2003 - V.216 - P. 597–603.
186. Yamamoto, Y.T. Bacterial expression of immunoglobulin fragments/ Y.T. Yamamoto, A. Skerra // Curr. Opin. Biotech. – 1993 - V.5 - P. 256–262.
187. Yamamoto, Y.T. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. In Vitro Cellular & Developmental Biology/ Yamamoto Y.T., Rajbhandari N., Lin X., Bergmann B.A., Nishimura Y., A.M. Stomp // Plant – 2001 - V. 37(3) - P. 349-353.
188. Yoshikazu, Yuki. Induction of toxin-specific neutralizing immunity by molecularly uniform rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine without plant-associated sugar modification/ Yoshikazu Yuki, Mio Mejima, Shiho Kurokawa, Tomoko Hiroiwa, Yuko Takahashi. Daisuke Tokuhara, Tomonori Nochi, Yuko Katakai, Masaharu Kuroda, Natsumi Takeyama, Koji Kashima, Michiyo Abe, Yingju Chen, Ushio Nakanishi, Takehiro Masumura, Yoji Takeuchi, Hiroko Kozuka-Hata, Hiroaki Shibata, Masaaki Oyama, Kunisuke Tanaka, Hiroshi Kiyono // Plant Biotechnology J. – 2013 - V.11 (7) - P. 799–808.
189. Zebedee S.L. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions/ S.L. Zebedee, R.A. Lamb //J. Virol. – 1988. – V.62(8) – P.2762-2772.
190. Zhao, G. An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses/ Zhao G., Y. Lin , Du L., Guan J., Sun S., Sui H., Kou Z., Chan C., Guo Y., Jiang S., Zheng B.-J., Y. Zhou // Virology Journal – 2010 - V.7 - P.9.

191. Zharikova, D. Influenza type A virus escape mutants emerge *in vivo* in the presence of antibodies to the ectodomain of matrix protein 2/ Zharikova D., Mozdzanowska K., Feng J., Zhang M., W. Gerhard // J. Virol. – 2005 - V.79(11) - P.6644–6654.
192. Zhou, J.Y. Expression of immunogenic S1 glyco-protein of Infectious Bronchitis Virus in transgenic potatoes/ Zhou J.Y., Wu J.X., Cheng L.Q., Zheng X.J., Gong H., Shang S.B., E.M. Zhou //J. Virol. – 2003 - V. 77 - P.9090–9093.
193. Zhou, J.Y. Generation of the transgenic potato expressing full-length spike protein of Infectious Bronchitis Virus/ Zhou J.Y., Cheng L.Q., Zheng X.J., Wu J.X., Shang S.B., Wang J.Y., J.G. Chen // J. Biotechnol. – 2004 - V. 111 - P.121–130.
194. Zimran, A. Pivotal trial with plant-cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease/ Zimran A., Brill-Almon E., Chertkoff R., Petakov M., Blanco-Favela F., Terreros Muñoz E., Solorio-Meza S., Amato D., Duran G., Giona F., Heitner R., Rosenbaum H., Giraldo P., Mehta A., Park G., Phillips M., Elstein D., Altarescu G., Szleifer M., Hashmueli S., Aviezer D // Blood - 2011 - V. 6.