

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)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пушино - 2016

Работа выполнена в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН)

**Научный руководитель:**

**Фирсов Алексей Петрович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФИБХ РАН, г. Пущино

**Официальные оппоненты:**

**Белецкий Игорь Петрович**, доктор биологических наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), зав. лабораторией клеточной инженерии ИТЕБ (РАН), г. Пущино

**Голденкова-Павлова Ирина Васильевна**, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, руководитель группы функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН), г. Москва

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), г.Москва

Защита состоится 6 октября 2016 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 002.121.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) по адресу: 142290, РФ, Московская область, г.Пущино, проспект Науки, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН и на сайте <http://www.ibpm.ru/>. Автореферат размещен на сайте <http://www.ibpm.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» июня 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор биологических наук

Кулаковская Т.В.

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** 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).

Для птицеводства всегда были актуальными проблемы, связанные с инфекционными заболеваниями, одним из которых является грипп птиц. На протяжении последних десяти лет ситуация по гриппу птиц в мире значительно осложнилась в связи с появлением особо патогенных штаммов вируса H5N1 и H7N7. При неблагоприятных условиях заражение птиц этими штаммами может привести к 100% гибели поголовья. В нашей стране очаги заболевания птичьим гриппом регулярно регистрируются в Дальневосточном и Южном федеральных округах. Наиболее эффективным средством борьбы с вирусом является вакцинация. 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.

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 противогриппозных вакцин может стать рекомбинантная вакцина на основе высоко консервативного пептида M2e

белка М2 вируса гриппа. Аминокислотная последовательность пептида М2е 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 М2е в создании вакцины является то, что пептид является слабым иммуногеном. Иммуногенность пептида может быть увеличена за счет использования молекулярных адъювантов (Lee et al., 2004), одним из которых является субъединица Б рицина клещевины (*Ricinus communis*). 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 следующие **задачи**:

1. Изучить возможность экспрессии пептида М2е отдельно и в трансляционном слиянии с  $\beta$ - глюкуронидазой 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  $\beta$ - глюкоуронидазой 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- $\beta$  – глюкоуронидаза и RTB-M130 в трансгенных растениях. Было показано, что уровень накопления M130- $\beta$  – глюкоуронидаза в трансгенных растениях ряски значительно превосходил таковой в растениях табака, тогда как накопление RTB-M130 достоверно не отличалось в двух изученных экспрессионных системах.

**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  $\beta$ - глюкоуронидазой 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.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на научных мероприятиях: 3-я международная конференция «PLANT EXPRESSION SYSTEMS FOR PHARMACOLOGICS» (Univeversity 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» (Пушино, 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).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 3 в реферируемых научных журналах (из списка ВАК) и 10 в сборниках тезисов конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 153 страницах текста и включает 33 рисунка и 14 таблиц. Список литературы содержит 194 источника.

**Благодарности.** Автор выражает огромную благодарность научному руководителю Фирсову Алексею Петровичу за совместную плодотворную работу и помощь в подготовке диссертации, а также руководителю лаборатории «Биотрон» Долгову Сергею Владимировичу и другим соавторам: Митюшкиной Т.Ю., Таранову А.И., Пушину А.С., Исмаиловой (Гиляшовой) Н.В., Шалойко Л.А., Вайнштейну А.М., Винокурову Л.М. за помощь в подготовке публикаций по теме работы.

#### **Объекты и методы исследования**

Для получения и наработки генно-инженерных конструкций использовали культуру *E. coli* штамма DH5 $\alpha$ , для трансформации растений - *A. tumefaciens* штамма CBE21. Трансформация растений табака *Nicotiana tabacum* сорта *L. cv. Petite Havana SR1* осуществлялась по методу Хорша (Horsch, 1985), ряски *Lemna minor* (местный изолят из р. Ока) – по протоколу к.б.н. Митюшкиной Т.Ю. (ФИБХ, г. Пушино). Оптимизация кодонного состава и дизайн набора перекрывающихся олигонуклеотидов синтезируемого 5'-фрагмента гена M2 были выполнены с помощью программ DNA2.0 Gene Designer (DNA2.0, USA) и Gene2Oligo (Rouillard et al., 2004). Все генно-инженерные работы проводили по методам, описанным Маниатисом с соавторами (Maniatis et al., 1982) с использованием ферментов фирм «Fermentas» (Литва) и «СибЭнзим» (Россия) в условиях,

рекомендованных производителями. Выделение растительной геномной ДНК проводили по методу Роджерса с соавторами (Rogers et al., 1994). Выделение тотальной РНК растений проводили с использованием набора реактивов QuantumPrep AquaPure RNA Isolation Kits («Bio-Rad», США) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Гистохимическое определение активности  $\beta$ -глюкуронидазы проводилось по методике, описанной Джеферсоном с соавторами (Jefferson et al., 1987) с использованием субстрата X-GLUC (Fermentas, Литва). Электрофоретическое разделение растительных белков проводили в 10% SDS-ПААГ по методу Лемли (Laemmly, 1970). После электрофореза протеины переносили на нитроцеллюлозную мембрану «BioRad» (США) методом электропереноса с использованием камеры Hoefer TE22 («Amersham», США) согласно инструкции фирмы-производителя. Вестерн-блот анализ растительных белков проводили с помощью поликлональных кроличьих антител к пептиду M2e («AbCam», Великобритания),  $\beta$ -глюкуронидазы («Sigma», США), субъединицы Б рицина. В качестве вторичных антител использовали антикроличьи IgG, конъюгированные со щелочной фосфатазой («Pierce», США) или с пероксидазой хрена («BioRad», США). Количественный анализ уровня экспрессии слитого белка M130- $\beta$ -глюкуронидаза в растениях проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием кроличьих поликлональных антител к  $\beta$ -глюкуронидазе («Sigma», США). Для детекции использовали субстрат для щелочной фосфатазы «Phosphatase Substrate Kit» («Pierce», США). Определение содержания субъединицы Б рицина в трансгенных растениях с помощью асиалофетуин - связанной ELISA проводили по методике Давсона с соавторами (Dawson et al., 1999), с использованием антител к субъединице Б рицина («AbCam», Великобритания) или к пептиду M2e («AbCam», Великобритания).

### Результаты

**Оптимизация кодонного состава 5'-концевой последовательности гена M2 вируса гриппа птиц H5N1. Клонирование 5'-фрагмента гена M2 в растительном экспрессионном векторе pBI121.** Нуклеотидная последовательность белка M2 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.). Для синтеза в трансгенных растениях был выбран аминокислотный фрагмент белка M2 длиной 43 аминокислотных остатка, включающий пептид M2e (с 1 по 22 а.о.), далее обозначенный как M143. Обратная трансляция

аминокислотной последовательности M143 в нуклеотидную была проведена с учетом рассчитанных частот использования кодонов в растениях ряски малой. В результате была получена нуклеотидная последовательность 5'-фрагмента гена M2 вируса гриппа птиц, представленная на рисунке 1. Синтез нуклеотидной последовательности M143 был выполнен методом лигирования перекрывающихся олигонуклеотидов. В результате были получены фрагменты ДНК ожидаемого размера. Синтетическая последовательность M143 была клонирована в векторе pUC19 и секвенирована.

А. ***M*SLLE***VETPTR***NEWECRCSDSSDPLVVAAS***I***GILHLIL***W***IL**

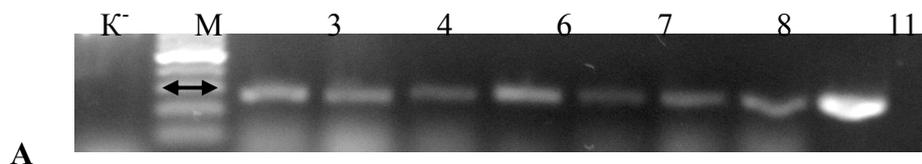
Б.

СТGATCTGCAGATG***TCCCTCCTCACTGAAGTCGAAACTCCTACTAGA***ААТГААТGGGAGTGCAGATGC  
TCTGATTCAGCGACCCCTTGGTGGTGGCGGCGTCCATCATCGGCATCCTGCATCTCATCCTCTG  
***GATCCTC***

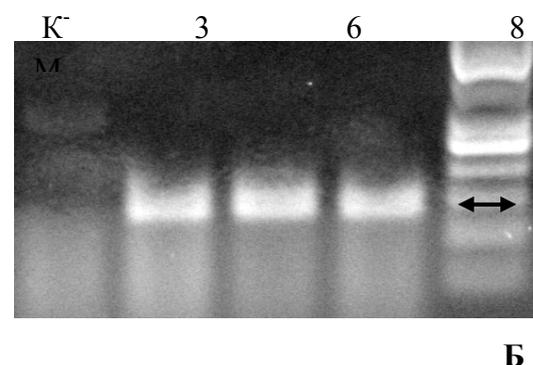
**Рисунок 1. Аминокислотная (А) и нуклеотидная (Б) последовательности фрагмента M143 с оптимизированным для экспрессии в растениях ряски кодонным составом. Подчеркнуты последовательности сайтов рестрикции, использованных для клонирования, курсивом выделен наиболее вероятный антигенный эпитоп.**

Для последующей работы была использована полученная плаزمиды, обозначенная как pUC19M143. Для проверки функциональности полученной синтетической последовательности 5'-фрагмента гена M2 в растениях, последовательность M143 была клонирована в растительном экспрессионном векторе pBI121 под контролем конститутивного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (35S CaMV) вместо предварительно вырезанной последовательности гена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). Полученная в результате плазмиды pBIM2 была использована в дальнейшей работе.

**Трансформация растений табака *Nicotiana tabacum* вектором pBIM2, анализ трансгенных растений.** Вследствие длительности процесса получения трансгенных растений ряски (около одного года), предварительные исследования экспрессии синтетических последовательностей в растениях проводились с использованием табака *Nicotiana tabacum*. В результате трансформации было получено 20 отдельных линий канамицин-устойчивых регенерантов. Вставка последовательности M143 была показана в 15 из 20 линий полученных трансформантов (рисунок 2, А). 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.



**Рисунок 2 А** - Результат ПЦР-анализа некоторых канамицинустойчивых линий табака с использованием праймеров к последовательности M143. **Б** - Результат ОТ-ПЦР анализа некоторых линий трансгенных растений табака с использованием праймеров к целевому фрагменту M143. Цифрами обозначены линии трансгенных растений; К<sup>-</sup> - табак, трансформированный вектором pBI121; М- ДНК маркеры «Fermentas» серии “Low Range” (Литва), стрелкой указан маркер 150 н.п. Ожидаемая длина фрагмента 129 н.п.



ОТ-ПЦР анализ с использованием праймеров к последовательности M143 показал амплификацию фрагмента ожидаемого размера (129 н.п.) во всех изученных линиях, что указывало на успешную транскрипцию синтетического гена M143. Вестерн - блот анализ препаратов тотального белка трансгенных растений с использованием антител к пептиду M2e вируса гриппа, не выявил накопления этого пептида. Возможно, это связано с тем, что короткие аминокислотные последовательности в растительных клетках нестабильны и редко накапливаются в заметных количествах. Тем не менее, нами была показана транскрипция экспрессионной кассеты, содержащей синтетический ген M143 в трансгенных растениях табака.

**Клонирование гена M143 в трансляционном слиянии с геном β-глюкуронидазы. Анализ экспрессии слитой последовательности в трансгенных растениях табака.** Нуклеотидная последовательность M143 была клонирована в трансляционном слиянии с 5'- концом гена β- глюкуронидазы (GUS) в векторе pBI121. Полученная конструкция (pBIM143) была использована для агробактериальной трансформации растений табака. Полученные *in vitro* растения 15 линий были проанализированы методом гистохимического окрашивания. Анализ активности β- глюкуронидазы показал различную степень окраски отдельных линий растений, трансформированных вектором pBIM143, варьирующую от интенсивной до очень слабой. Для дальнейшего культивирования было отобрано 12-ть линий канамицин-устойчивых растений табака, продемонстрировавших наибольшую интенсивность окрашивания. ПЦР - анализ растительной ДНК с праймерами

к целевой последовательности M143- GUS показал наличие специфического фрагмента размером 1024 н.п. в 11-ти линиях из 12-ти проанализированных. Полученные трансгенные растения были переданы в теплицу для адаптации и дальнейшего роста. Через 3 недели после адаптации в теплице высечки из листовых пластинок табака были проанализированы на наличие активности  $\beta$ - 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* (таблица 1).

**Таблица 1 - Результат гистохимического анализа трансгенных растений табака разного возраста (*in vitro*, 3 недели и 6 месяцев роста в теплице)**

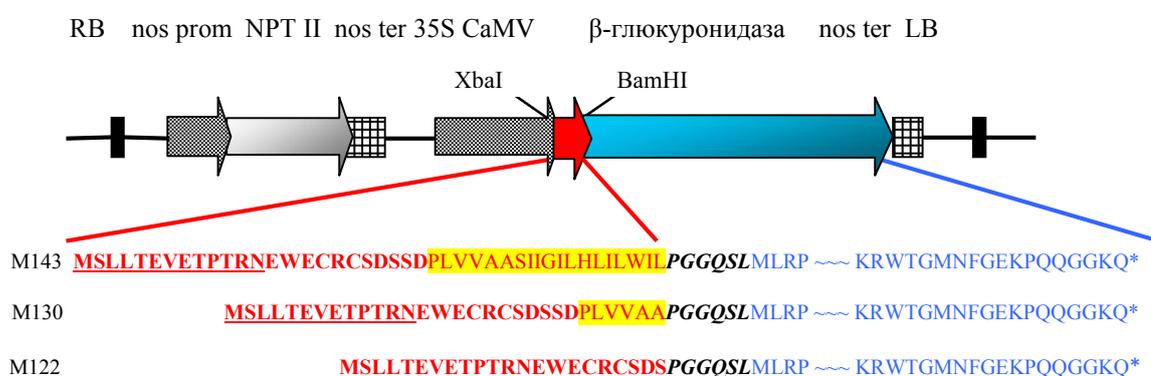
pВIM143	4в	7в	7с	7d	8а	8в	9	11а	11с	12а	12в
<i>in vitro</i>	+++	+++	++	+	++	+	+	+	+++	+	+
3 нед.	++	++	+	+/-	+	-	+/-	+	++	+/-	+/-
6 мес.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Знаком + обозначено окрашивание растительных тканей, - отсутствие окраски и +/- частичное окрашивание ткани.

Через 6 месяцев культивирования в теплице трансгенные растения табака были еще раз проанализированы методом гистохимического окрашивания. В результате было показано отсутствие экспрессии  $\beta$ - глюкуронидазы в растениях, трансформированных вектором pВIM143 (таблица 1) Вестерн-блот анализ препаратов тотального белка, выделенного из листьев трансгенных растений, с использованием антител против  $\beta$ - глюкуронидазы, подтвердил отсутствие этого протеина во всех изученных линиях.

Возможно, что на характер синтеза слитого белка в трансгенных растениях табака могло негативно повлиять наличие внутримембранного гидрофобного домена белка M2 (25 -43 а. о.) в пептиде M143, поэтому, исходя из полученных результатов, были клонированы укороченные варианты последовательности M143, кодирующие пептиды с частично или полностью удаленным трансмембранным доменом. Нуклеотидные последовательности укороченных вариантов аминокислотного терминального фрагмента белка M2, длиной 30 а.о. (M130) и 22 а.о. (M122) были клонированы в векторе pВI121 в трансляционном слиянии с 5'-концом гена  $\beta$ - глюкуронидазы. Полученные вектора, обозначенные как pВIM130 и pВIM122 (рисунок 3), были использованы для агробактериальной трансформации растений табака. В результате было получено 22 независимые канамицин-устойчивые линии растений, трансформированных вектором

pВIM130 и 24 линии, трансформированных вектором pВIM122. Анализ активности  $\beta$ -глюкуронидазы в *in vitro* растениях показал различную степень окраски отдельных линий растений, от интенсивной до очень слабой, так же как и для растений, трансформированных вектором pВIM143. Для дальнейших исследований было отобрано по 15-ть линий канамицин-устойчивых растений, степень гистохимического окрашивания которых была наибольшей. Амплификация специфического фрагмента M130- GUS или M122-GUS размером 1000 н.п. и 976 н.п., соответственно, была показана во всех изученных линиях растений. Трансгенные растения табака были переданы в теплицу для дальнейшего роста.



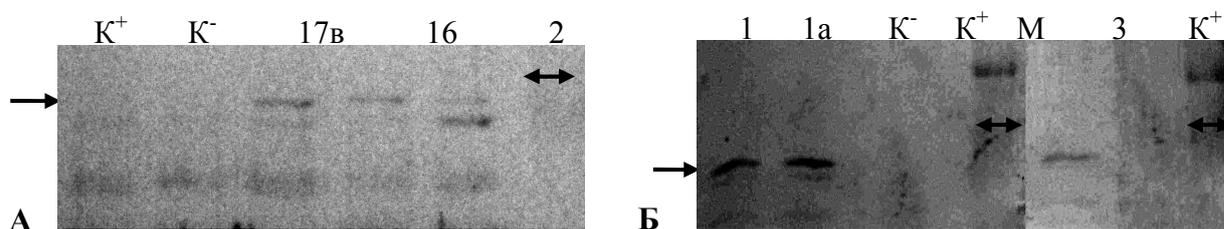
**Рисунок 3. Схема экспрессионных кассет полученных векторов pВIM143, pВIM130 и pВIM122.** Цветом выделены последовательности слитых белков: красным – фрагменты M143, M130 и M122, синим - фрагмент  $\beta$ -глюкуронидазы, желтым- трансмембранный домен, подчеркнута антигенная детерминанта пептида M2e.

После 6 месяцев культивирования в теплице трансгенные растения были еще раз проанализированы на активность  $\beta$ -глюкуронидазы. В результате было показано, что экспрессия  $\beta$ -глюкуронидазы детектировалась во всех растениях, трансформированных векторами pВIM130 и pВIM122, причем интенсивность окрашивания листовых пластинок примерно соответствовала интенсивности окрашивания тканей *in vitro*. Для последующего Вестерн-блот анализа было отобрано по 3 линии растений, которые окрашивались наиболее быстро и интенсивно. В результате анализа общего белка, выделенного из листьев трансгенных растений табака с использованием антител к  $\beta$ -глюкуронидазе было показано присутствие в препаратах белковых полос молекулярной массой около 74кДа, что соответствовало ожидаемому размеру слитых белков M130-  $\beta$ -глюкуронидаза и M122-  $\beta$ -глюкуронидаза (рисунок 4).



**Рисунок 4 - Результат Вестерн-блот анализа некоторых линий трансгенных растений табака трансформированных векторами pVIM130 (А) и pVIM122 (Б) с использованием антител к β-глюкуронидазе.** Цифрами обозначены линии трансгенных растений табака; K<sup>-</sup> - нетрансгенное растение. K<sup>+</sup> - растения табака, трансформированные вектором pV121; M - маркер молекулярной массы «Fermentas», двойной стрелкой обозначен маркер 85 кДа. Стрелкой указан слитый белок M130(M122)- β- глюкуронидаза. Ожидаемый размер слитого белка около 74 кДа.

Детектируемые антителами полосы в препаратах трансгенных растениях мигрировали медленнее соответствующих полос в положительном контроле – белковых препаратов растений, трансформированных вектором pV121 – 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 (рисунок 5).

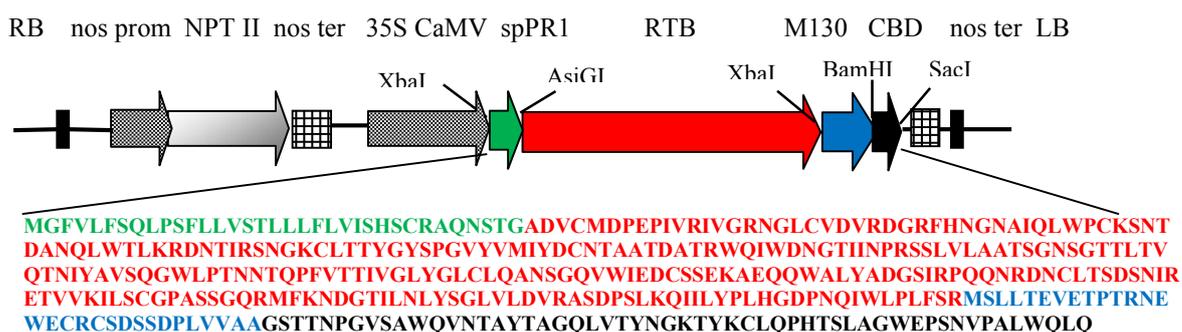


**Рисунок 5 - Результат Вестерн-блот анализа некоторых линий трансгенных растений табака трансформированных векторами pVIM130 (А) и pVIM122 (Б) с использованием антител к пептиду M2e.** Цифрами обозначены линии трансгенных растений табака; K<sup>-</sup> - нетрансгенное растение.. K<sup>+</sup> - растения табака, трансформированные вектором pV121; M - маркер молекулярной массы «Fermentas», двойной стрелкой обозначен маркер 85 кДа. Стрелкой указан слитый белок M130(M122)- β- глюкуронидаза. Ожидаемый размер слитого белка около 74 кДа.

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. Таким образом, была подтверждена экспрессия пептида M2e вируса гриппа птиц в трансляционном слиянии с β- глюкуронидазой в трансгенных растениях табака. Было показано, что оптимальным

вариантом для экспрессии в трансгенных растениях является аминотерминальный фрагмент гена M2, включающий только пептид M2e или пептид M2e и короткий фрагмент трансмембранного домена. Для дальнейших исследований был выбран вариант M130 (5'-фрагмент гена M2, кодирующий первые 30 N-концевых аминокислотных остатков).

**Клонирование нуклеотидной последовательности субъединицы Б рицина. Получение вектора для экспрессии пептида M2e в трансляционном слиянии с субъединицей Б рицина.** Нуклеотидная последовательность субъединицы Б рицина (RTB) была клонирована в векторе pUC18, в качестве матрицы при ПЦР была использована тотальная ДНК, выделенная из листьев местного сорта клещевины (*Ricinus communis*). Анализ клонированной нами нуклеотидной последовательности показал её полное совпадение с большинством последовательностей RTB представленных в базе данных GenBank (ADG29117, CAA26939, CAA37095, EEF27734, AFH96941). Полученный вектор был обозначен как pUC18RTB. Далее последовательность RTB была клонирована в трансляционном слиянии с 5'-концом последовательности M130.

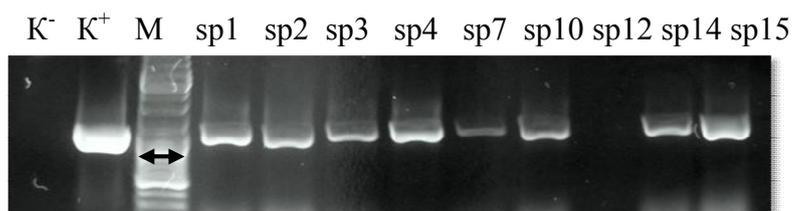


**Рисунок 6. Схема экспрессионной кассеты вектора pBIspRBM130 и аминокислотная последовательность слитого белка spPR1-RTB-M130-CBD. Цветом выделены фрагменты целевого белка: зеленым - сигнальный пептид (spPR1), красным - субъединица Б рицина (RTB), синим - фрагмент M130, черным - хитинсвязывающий домен (CBD).**

В качестве сигнальной последовательности нами был выбран N- концевой сигнальный пептид белка PR1a табака (spPR1), определяющий транспорт белков в эндоплазматический ретикулум. Сигнальный пептид spPR1 был клонирован в трансляционном слиянии с 5'-концом нуклеотидной последовательности субъединицы Б рицина. К 3' концу фрагмента M130 была добавлена последовательность хитинсвязывающего домена хитиназы A1 *Bacillus circulans* (CBD). В результате был получен растительный экспрессионный вектор, содержащий слитую последовательность spPR1-RTB-M130-CBD под контролем конститутивного 35S CaMV промотора (рисунок 6).

Плазмида, обозначенная как pBIspRBM130, была использована для агробактериальной трансформации растений табака и ряски.

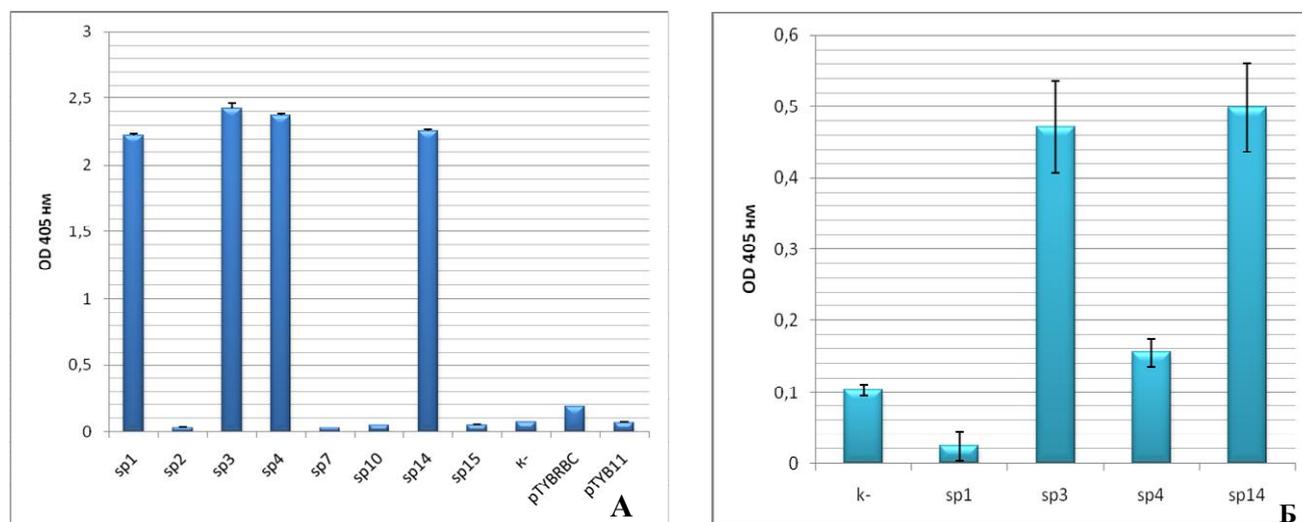
**Получение и анализ трансгенных растений табака, содержащих последовательность слитого гена RTB-M130.** После трансформации табака вектором pBIspRBM130 было получено 14 независимых линий, устойчивых к канамицину. Для подтверждения трансгенной природы полученных растений был проведен ПЦР - анализ геномной ДНК, с использованием праймеров, позволяющих амплифицировать целевую последовательность. В результате было отобрано восемь линий трансгенных растений, содержащих слитую нуклеотидную последовательность сигнального пептида (spPR1) -субъединицы Б рицина (RTB)- 5'-фрагмента гена M2 (M130), далее обозначенную как RTB-M130 (рисунок 7). Отобранные линии трансгенных растений были укоренены и перенесены в теплицу для выращивания. Анализ экспрессии слитой последовательности RTB-M130 в трансгенных растениях табака был проведен после трех месяцев культивирования в теплице.



**Рисунок 7. Результат ПЦР-анализа геномной ДНК растений табака, трансформированных вектором pBIspRBM130.** Обозначения: sp1-15 - линии трансгенных растений табака; K<sup>-</sup> –тотальная ДНК нетрансгенных растений табака; K<sup>+</sup> – плазмида pBIspRBM130; M – ДНК-маркеры «Fermentas», стрелкой указан маркер 1000 н.п., ожидаемая длина фрагмента 1091 н.п.

Для детекции RTB в составе слитого белка был использован метод асиалофетуин - связывающей ELISA. Данная методика характеризуется высокой чувствительностью и позволяет судить об активности рекомбинантной субъединицы Б рицина, поскольку к взаимодействию с асиалофетуином способен только правильно процессированный белок, содержащий два сайта связывания с углеводами. Для анализа биологической активности RTB, синтезируемой в трансгенных растениях и полученной в бактериальной системе нами была клонирована последовательность RTB в бактериальном экспрессионном векторе pTYB11. Для изучения активности субъединицы Б рицина, были использованы осветленные лизаты клеток *E.coli*, экспрессирующих слитую последовательность интеин-RTB (pTYB11RBC). В качестве отрицательного контроля были использованы экстракты

нетрансгенных растений табака, а также лизаты клеток *E.coli*, синтезирующих только интеин (pTYB11). Для количественной оценки синтеза целевого белка в трансгенных растениях табака был построен калибровочный график с использованием очищенных препаратов рицина, выделенного из семян клещевины. Результаты анализа трансгенных растений табака с помощью асиалофетуин - связывающей ELISA представлены на рисунке 8. В четырех линиях трансгенных растений табака (sp1, sp3, sp4 и sp14) с использованием антител к субъединице Б рицина была показана экспрессия RTB в составе целевой последовательности. В бактериальных лизатах pTYB11RBC значение оптической плотности находилось на уровне отрицательных контролей – лизатов клеток *E.coli* pTYB11 и экстрактов нетрансгенных растений табака (рисунок 8, А). Полученные результаты указывают на корректный процессинг синтезируемой субъединицы Б рицина в составе слитого белка RTB-M130 в четырех линиях трансгенных растениях табака. При использовании антител к пептиду M2e, присутствие последовательности M130 в составе RTB-M130 было подтверждено в двух линиях трансгенных растений, sp3 и sp14 (рисунок 8, Б). 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.



**Рисунок 8 - Результат анализа экспрессии слитой последовательности RTB-M130 в растениях табака, трансформированных вектором pBIsprBVM130, с помощью асиалофетуин-связывающей ELISA. А- с использованием антител к субъединице Б рицина, Б- с использованием антител к пептиду M2e. Обозначения: sp1- 15 –линии трансгенных растений табака; K<sup>-</sup> - экстракт не трансформированного растения табака; pTYB11 и pTYBR11RBC - осветленные лизаты клеток *E.coli*, синтезирующих интеин и слитую последовательность интеин- субъединица Б рицина, соответственно.**

Количество RTB-M130, синтезированного в трансгенных растениях табака, было определено с использованием антител к субъединице Б рицина (таблица 2). 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 общего растворимого белка. Полученные результаты свидетельствуют о сопоставимой в сравнении с аналогичными работами экспрессии последовательности RTB в составе целевого белка в растениях табака. Например, 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 асиалофетуин-связывающей ELISA, 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. Полученные данные свидетельствовали об активности полученного с помощью экспрессии в трансгенных растениях табака антигена (Woffenden et al., 2008).

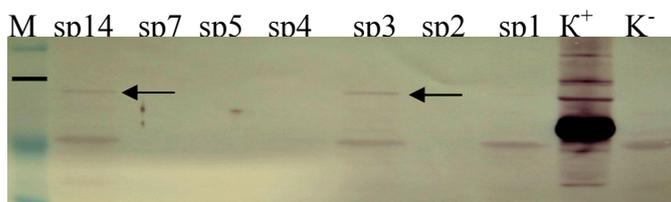
**Таблица 2 - Содержание субъединицы Б рицина (RTB) в различных линиях трансгенных растений табака**

линия	мкг RTB /г FW	мг TSP /г FW	% RTB
sp1	2,13	19,14	0,012
sp2	0,03	18,4	0,0002
sp3	3,29	20,14	0,02
sp4	2,94	16,8	0,019
sp7	0,03	19,3	0,0001
sp10	0,04	19,9	0,0001
sp14	2,42	20,5	0,011
sp15	0,03	16,4	0,0002
k-	0,00	18,5	0,00
pTYB11	0,00	14,71	0,00
pTYBRBC	0,04	27,52	0,0002

**TSP** - общий (тотальный) растворимый белок, **FW**- сырой вес, **% RTB** - содержание RTB по отношению к общему растворимому белку. Линии трансгенных растений обозначены как на рисунке 7.

Для подтверждения экспрессии целевой последовательности RTB-M130 в растениях табака, трансгенные линии были проанализированы методом Вестерн-блот с использованием антител к RTB и пептиду M2e. При использовании антител к пептиду M2e было показано, что в двух линиях трансгенных растений табака, обозначенных как sp14 и sp3, синтезируется белок размером около 80-82 кДа (рисунок 9). В двух других линиях трансгенных растений табака, sp1 и sp4, так же как и в отрицательном контроле, антитела к M2e не детектировали данный пептид.

Расчитанный размер для аминокислотной последовательности RTB-M130 с учетом возможных вариантов гликозилирования, составляет от 39 до 42 кДа. Исходя из высокой специфичности используемых антител к пептиду M2e, а также отсутствию в нетрансгенных растениях табака соответствующего сигнала, мы предполагаем, что слитый белок RTB- M130 может синтезироваться в трансгенных растениях табака в виде димера. Косвенным подтверждением этого предположения может служить работа Картера с соавторами в которой изучали экспрессию инсулина, слитого с субъединицей Б рибина, в трансгенных растениях картофеля (*Solanum tuberosum*). Авторами было показано, что синтез слитого белка инсулин-RTB в клубнях картофеля происходит в виде мультимерных агрегатов. По мнению авторов, мультимеризация происходит за счет большого количества хаотичных дисульфидных связей в слитом белке инсулин-RTB (Carter et al., 2010).



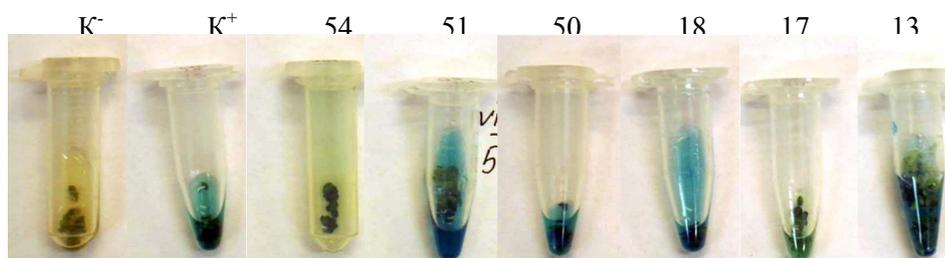
**Рисунок 9. Результат Вестерн-блот анализа трансгенных растений табака, содержащих слитую последовательность RTB – M130 с помощью антител к пептиду M2e.** Обозначения: sp1-14- линии трансгенных растений табака; K<sup>-</sup> - экстракт не трансгенного табака; K<sup>+</sup>- пептид M130, синтезированный в бактериальных клетках; M-маркеры, чертой обозначен маркер 85 кДа. Стрелками указан RTB-M130 (предполагаемый димер, размером около 80 кДа).

Присутствие аминокислотной последовательности размером около 80 кДа, не детектируемой в отрицательных контролях, было показано в линиях sp14 и sp3 трансгенных растений табака с использованием антител к RTB, что являться дополнительным подтверждением предположения о димеризации целевого продукта.

Результаты асиалофетуин- связывающей ELISA с использованием антител к RTB и пептиду M2e, свидетельствуют о наличии правильно процессированной субъединицы Б рицина в составе слитой последовательности RTB-M130 в двух линиях трансгенных растений табака (sp14 и sp3). 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 эти линии в дальнейшей работе.

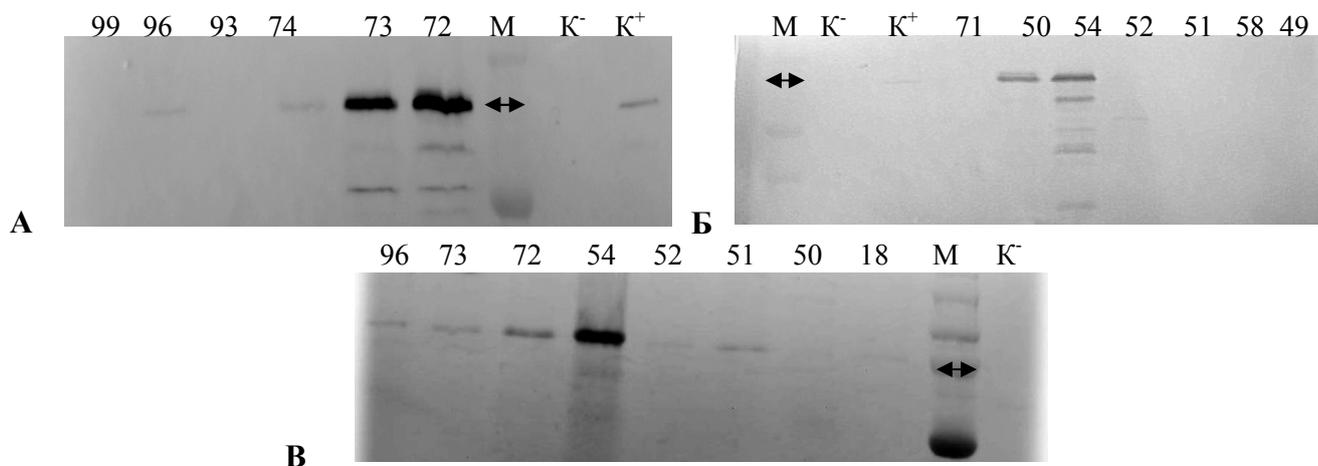
**Анализ экспрессии гена пептида M2e в трансгенных растениях ряски.** Трансформация растений ряски (*Lemna minor*) векторами pVIM130 и pBIspRBM130 проводилась сотрудниками лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) под руководством с.н.с. к.б.н. Митюшкиной Т.Ю. по разработанной ранее оригинальной методике.

**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. В результате гистохимического анализа для дальнейших исследований было отобрано 25 линий, окрашивающихся наиболее интенсивно (рисунок 10). Для подтверждения вставки целевого фрагмента M130 в геном трансформантов был проведен ПЦР - анализ, с использованием праймеров к целевой последовательности. В результате наличие полноразмерной последовательности M130- β-глюкуронидаза было показано в геномной ДНК 21 предварительно отобранных линиях ряски. После подтверждения трансгенной природы полученных растений, был проведен анализ экспрессии целевой последовательности M130- β-глюкуронидаза в этих линиях.



**Рисунок 10. Результат окрашивания субстратом X-GLUC (Fermentas) некоторых канамицинустойчивых листочков ряски.** Цифрами обозначены различные линии ряски, K<sup>-</sup> - нетрансгенное растение, K<sup>+</sup> - трансгенное растение, трансформированное вектором pBI121

Методом Вестерн-блот анализа общего белка, выделенного из трансгенных листецов, с использованием антител к  $\beta$ -глюкуронидазе были детектированы белковые полосы молекулярной массой около 74 кДа, что соответствовало ожидаемому размеру слитого белка M130-  $\beta$ - глюкуронидаза (74 кДа). Присутствие слитого 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 11А, Б). Детектируемые антителами полосы в трансгенных линиях ряски располагались на мембране несколько выше относительно положительного контроля,  $\beta$ - глюкуронидазы, что свидетельствовало о наличии пептидного партнера.

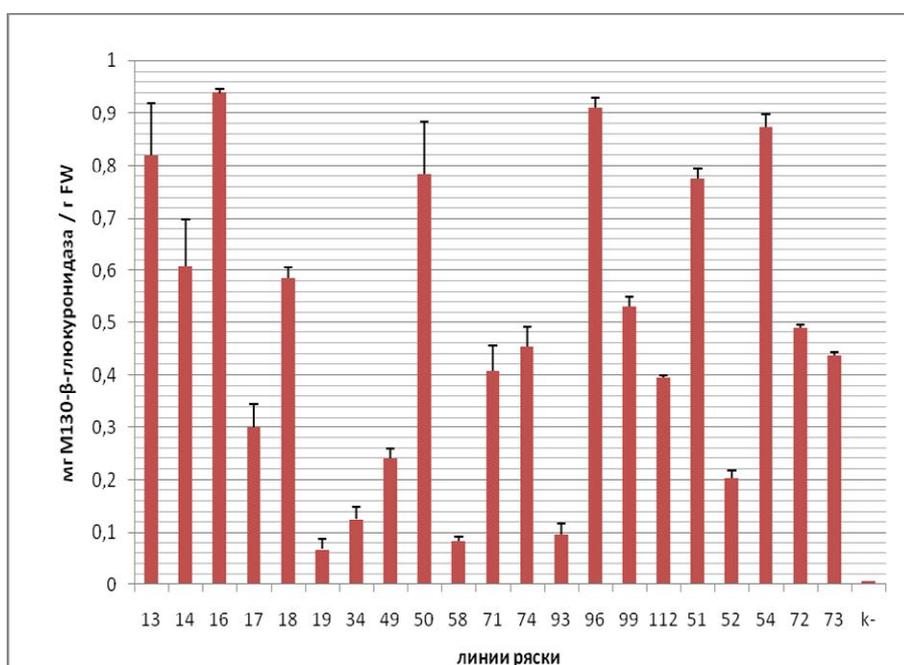


**Рисунок 11. Результат вестерн-блот анализа некоторых линий трансгенных растений ряски, трансформированных вектором рВIM130, с использованием антител к  $\beta$ -глюкуронидазе (А, Б) и пептиду M2e (В). Цифрами обозначены линии трансгенных растений ряски, K<sup>+</sup>- растение, трансформированное вектором рВI121, K<sup>-</sup> - нетрансгенное растение, M- маркеры молекулярного веса белков «BioRad», стрелкой обозначен маркер 75 кДа, ожидаемый размер детектируемого белка - 74 кДа.**

При Вестерн-блот анализе белковых препаратов с антителами к пептиду M2e, пептид детектировался только в 8-ми линиях ряски -13, 17, 18, 50, 51, 54, 72, и 73 (рисунок 11, В). Масса узнаваемой антителами аминокислотной последовательности составляла около 74 кДа, что соответствовало белку, детектируемому с помощью антител к  $\beta$ -глюкуронидазе. В препаратах белка из нетрансгенных растений, так же как и растений, экспрессирующих только  $\beta$ - глюкуронидазу, соответствующий сигнал отсутствовал. При сравнении этих данных с ранее полученными результатами Вестерн-блот анализа растений табака, содержащих последовательность M130-  $\beta$ -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  $\beta$ - глюкоуронидазе, препараты трансгенных растений ряски демонстрировали более сильный сигнал в сравнении с белковыми препаратами трансгенных растений табака. Полученные данные подтверждают более высокий уровень синтеза слитого белка M130-  $\beta$ -глюкоуронидаза в растениях ряски малой в сравнении с растениями *Nicotiana tabacum*.

Оценка содержания слитого белка M130- $\beta$ -глюкоуронидаза в препаратах общего растворимого белка трансгенных растений ряски методом иммуноферментного анализа показала (рисунок 12), что количество синтезируемого слитого белка в трансгенных растениях находится на уровне 0,1-0,9 мг на грамм сырого веса (соответствует 0,11% - 2% от общего растворимого белка).



**Рисунок 12** - Результат иммуноферментного анализа экспрессии слитого белка M130- $\beta$ -глюкоуронидаза в трансгенных линиях ряски. Содержание слитого белка на грамм сырого веса (FW) Цифрами обозначены линии ряски, K<sup>-</sup> - нетрансгенное растение ряски.

Полученный в трансгенных растениях ряски уровень экспрессии слитого белка M130- $\beta$ -глюкоуронидаза является весьма высоким. Например, в работе Вигдоровица с соавторами (Wigdorovitz et al., 2004) уровень экспрессии  $\beta$ - глюкоуронидазы 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).

**Анализ экспрессии последовательности пептида M2e слитой с субъединицей B рицина.** После трансформации ряски вектором pBIspRBM130 было получено 23

независимые линии растений, устойчивых к канамицину. ПЦР - анализ геномной ДНК этих линий, с использованием праймеров, позволяющих амплифицировать участок ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность RTB-M130 показал амплификацию фрагмента ДНК, размером около 1100 н.п., что соответствовало ожидаемому. Анализ экспрессии слитой последовательности RTB-M130 в полученных линиях трансгенных растений ряски был проведен с помощью асиалофетуин-связывающей ELISA, с использованием антител к субъединице Б рицина. Препараты общего белка трансгенных растений ряски были выделены из листочков, растущих один месяц на селективной среде. В качестве негативного контроля были использованы экстракты нетрансгенных растений ряски, позитивного - трансгенные растения табака линии sp14.

Синтез субъединицы Б рицина в составе слитого белка был показан в 20-ти линиях трансгенных растений ряски из 23-х (рисунок 13). Количественное содержание слитого белка в различных линиях варьировало от 0,5 мкг (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%. Кроме того, было отмечено, что количество слитого белка RTB-M130 в трансгенных растениях табака составляло около 2,4 мкг на грамм сырого веса, что соответствовало большинству изученных линий трансгенных растений ряски (таблица 3). Процентное содержание субъединицы Б рицина по отношению к общему белку 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  $\beta$ - глюкоуронидазы, следует отметить, что уровень накопления последней в трансгенных растениях ряски (порядка 2% от общего растворимого белка) намного превосходит уровень синтеза слитой последовательности RTB-M130. Наблюдаемые отличия могут иметь несколько причин. Во-первых, при использовании асиалофетуин-связанной ELISA 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 асиалофетуин - связывающей ELISA. Во-вторых, субъединица Б рицина может более активно, чем  $\beta$ -глюкоуронидаза подвергаться деструкции, вследствие чего её меньше накапливается в растительных клетках (Chamberlain et al., 2008).

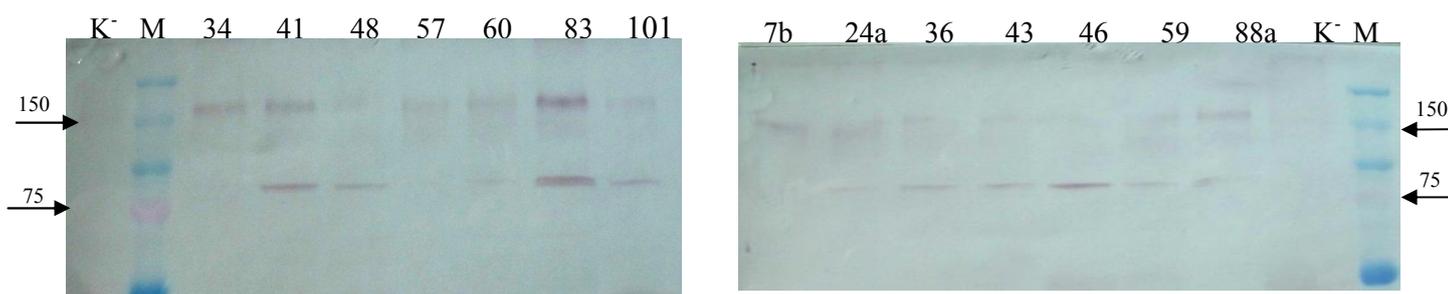
**Таблица 3 - Обобщенный результат анализа экспрессии слитой последовательности RTB - M130 в трансгенных растениях ряски**

№ линии	Общий белок (TSP), мг/г FW	Асиалофетун - связывающая ELISA		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	+	+
<b>41</b>	<b>19,2</b>	<b>1,717</b>	<b>0,01</b>	+	+
42	30,9	1,544	0,005	-	+
43	18,6	0,054	0,0003	+	+
<b>46</b>	<b>22,1</b>	<b>1,48</b>	<b>0,01</b>	+	-
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	+	+
<b>81</b>	<b>28,3</b>	<b>2,49</b>	<b>0,01</b>	+	+
<b>83</b>	<b>20,1</b>	<b>2,04</b>	<b>0,01</b>	+	+
88a	18,9	1,62	0,01	+	+
88b	26,6	0,73	0,003	-	+
91	27,7	1,93	0,007	-	+
<b>101</b>	<b>18,5</b>	<b>1,66</b>	<b>0,01</b>	+	+
табак sp14	20,5	2,4	0,01		

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

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 последовательностью сигнального пептида PR1 табака, что также может 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 растений ряски, содержащих последовательность RTB-M130 с использованием антител к пептиду M2e. Как представлено на рисунке 14, 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 11a, 24a, 26, 36, 41, 43, 46, 48, 59, 83, 88a и 101 соответствует предполагаемому димерному варианту слитой последовательности RTB-M130, синтезируемой в трансгенных растениях табака линий sp3 и sp14 (рисунок 14). Помимо этого, практически во всех линиях трансгенной ряски (за исключением 46) 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, образующихся в трансгенных растениях ряски.



**Рисунок 14. Результат Вестерн-блот анализа некоторых линий трансгенных растений ряски, содержащих нуклеотидную последовательность RTB-M130, с использованием антител к пептиду M2e. 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**

По-видимому, мультимеризация является характерным процессом при экспрессии гетерологичных белков, включающих последовательность субъединицы Б рицина. Так, в работе Картера 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- связывающей 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). Обобщенные результаты анализа экспрессии последовательности RTB-M130 в трансгенных растениях ряски представлены в приведенной таблице 3.

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. Линии трансгенных растений ряски 41, 46, 81, 83 и 101, накапливающие наибольшее количество целевого белка (на один грамм сырой массы и в процентном соотношении к тотальному растворимому белку) будут использованы в дальнейших исследованиях.

## Выводы работы

1. Показана стабильная экспрессия в трансгенных растениях пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1 в трансляционном слиянии с белком  $\beta$ -глюкуронидаза, уровень накопления слитого белка пептид M2e- $\beta$ -глюкуронидаза в трансгенных растениях ряски малой составлял 0,5-0,9 мг/г сырого веса растений;
2. Показана стабильная экспрессия пептида M2e 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 M2e-субъединица Б рицина специфично связываться с гликопротеином асиалофетуином;
4. Проведённый количественный анализ экспрессии рекомбинантного белка пептид M2e-субъединица Б рицина, показал, что накопление слитой последовательности составляет до 1,5-2,5 мкг на грамм сырой массы независимо от вида растений.

## Список публикаций по теме диссертации

### Публикации в рецензируемых журналах:

1. **Тарасенко И.В.**, Таранов А.И., Фирсов А.П., Долгов С.В. Экспрессия нуклеотидной последовательности пептида М2е вируса гриппа птиц в трансгенных растениях табака. Биотехнология, 2012, № 4, стр. 18-25
2. Фирсов А.П., **Тарасенко И.В.**, Пушин А.С., Шалойко Л.А., Винокуров Л.М., Долгов С.В. Экспрессия пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансгенных растениях табака в трансляционном слиянии с субъединицей В рицина. Биотехнология, 2015, №2, стр. 55-64
3. Firsov A., **Tarasenko I.**, Mitouchkina T., Ismailova N., Shaloiko L., Vainstein A., Dolgov S. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants. Molecular Biotechnology, 2015, Volume 57, Issue 7, pp 653-661

### Материалы научных конференций и тезисы докладов:

1. Firsov A.P., **Tarasenko I.V.**, Dolgov S.V. Expression of the avian influenza virus H5N1 M2e peptide fused with  $\beta$ -glucuronidase in transgenic tobacco plants. The Third International Conference plant expression systems for pharmacologic, University of Verona, Italy, 2009
2. **Тарасенко И.В.**, Таранов А.И., Фирсов А.П., Долгов С.В. Экспрессия пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в растениях для создания универсальной съедобной вакцины. 15-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Пущино, 2011, стр. 308
3. **Тарасенко И.В.**, Таранов А.И., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В. Экспрессия пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в растениях ряски малой (*Lemna minor*) для создания универсальной противогриппозной съедобной вакцины. Научная конференция по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова», Москва, 2011, том 2, стр. 69
4. **Тарасенко И.В.**, Гиляшова Н.В., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В. Экспрессия слитого гена субъединицы В рицина (*Ricinus communis*) с геном пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансгенных растениях ряски (*Lemna minor*). Всероссийская молодежная конференция «Актуальные проблемы химии и биологии», Пущино, 2012, стр. 101-102
5. **Тарасенко И.В.**, Фирсов А.П., Гиляшова Н.В., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В. Экспрессия синтетического гена пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в растениях. Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений», г. Минск, 2013, стр.237
6. **Tarasenco I.V.**, Firsov A.P., Dolgov S.V. Analysis of transgenic tobacco plants containing the nucleotide sequence of M2e of the avian influenza virus H5N1 in translation fusion with the gene B

subunit of ricin castor (*Ricinus communis*). 17-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, г. Пушкино, 2013, стр. 368

7. **Тарасенко И.В.**, Фирсов А.П., Долгов С.В. Анализ экспрессии 5'-концевой последовательности пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансляционном слиянии с геном субъединицы Б рицина клещевины (*Ricinus communis*) в трансгенных растениях табака. 5-я Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», г. Ростов-на-Дону, 2013, стр. 184

8. Firsov A.P., **Tarasenko I.V.**, Mitiouchkina, T.Y., Gylashova N.V., Dolgov S.V. The expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in translational fusion with subunit B of ricin in the transgenic tobacco and duckweed plants. Международная научная конференция по биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан, 2014, стр.202

9. Firsov A.P., **Tarasenko I.V.**, Mitioushkina T.Y., Gilyashova N.V., Dolgov S.V. The expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in translational fusion with subunit B of ricin in the transgenic tobacco and duckweed plants. Mucosal vaccines adjuvants & delivery 2013 Conference, Copenhagen, Denmark, 2013

10. Firsov A.P., **Tarasenko I.V.**, Mitioushkina T.Y., Gilyashova N.V., Dolgov S.V. The expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in translational fusion with subunit B of ricin in the transgenic duckweed plants. International association for plant biotechnology congress 2014, Melbourne, Australia, 2014