

УДК: 581.6

Д.К. Бейсенов\*, Г.Э. Станбекова, Л.Т. Надирова, Б.К. Искаков  
 Институт молекулярной биологии и биохимии им М.А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан  
 \*e-mail: daniyar.b@mail.ru

### Синтез белка оболочки L1RA вируса оспы овец в растениях

Ген *SPPV-NISKHI-56* вируса оспы овец кодирует ортолог иммунодоминантного белка L1R вируса осповакцины. Последовательность гена, кодирующая гидрофильную часть белка (L1RA) была искусственно синтезирована и клонирована в плазмиду pET-19b для экспрессии в бактериях.

Для трансформации растений табака (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun-NN) была получена рекомбинантная ДНК-конструкция на основе вектора pCAMBIA2300, содержащая 35S промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV), 5'НТП гРНК AMV, His-Tag, ген белка L1RA и терминатор транскрипции гена нопалин синтазы (NOS-ter). Трансформированные растения - регенеранты, образовавшие корни на среде с канамицином, были проверены с помощью реакции обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) на наличие соответствующей мРНК. Рекомбинантный белок удалось детектировать в нескольких трансгенных растениях с помощью специфических антител к белку L1RA.

**Ключевые слова:** вирус оспы овец, трансгенные растения.

D. Beisenov, G. Stanbekova, L. Nadirova, B. Iskakov

#### Sheep pox viral envelope protein L1RA synthesis in plants

Sheep pox viral gene *SPPV-NISKHI-56* encodes ortholog of immunodominant protein L1R of vaccinia virus. Gene sequence that encodes hydrophilic part of the protein (L1RA) was artificially synthesized and cloned in pET-19b plasmid for expression in bacteria.

Recombinant DNA – construct based on pCAMBIA2300 vector was designed for transformation of the tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun-NN). This construct contained 35S promoter of cauliflower mosaic virus, 5'UTR of gRNA AMV, His-Tag, gene for L1RA protein and NOS terminator. Transformed regenerated plants that produced root on the medium with kanamycin were analyzed for the presence of necessary mRNA by RT-PCR. Recombinant protein was detected in several transgenic plants by specific antibodies for L1RA.

**Key words:** sheep pox virus, transgenic plants.

Д.К. Бейсенов, Г.Э. Станбекова, А.В. Жигайлов, Б.К. Ысқақов

#### Өсімдіктерде қой шешегі вирусы қабықшасының L1RA ақуызының синтезі

Қой шешегі вирусының *SPPV-NISKHI-56* гені адам шешегі вирусының L1R иммундық доминантты ақуыз ортологын кодтайды. Ақуыздың гидрофилді бөлігін (L1RA) кодтайтын геннің тізбегі жасанды синтезделіп, бактерияларда экспрессиясы үшін pET-19b плазмидіде клондалған.

Темекі өсімдігінің (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun-NN) трансформациясы үшін 35S промотор CaMV, 5'AMV, His-Tag, L1RA ақуызының гені және транскрипцияның терминаторынан (NOS-ter) құралатын pCAMBIA2300 векторы негізінде рекомбинантты ДНК-құрылымы алынды. Трансформацияланған өсімдік канамицин бар ортада түзілген тамырларының регенеранты, олар сәйкес мРНК-ның болуына қатысты кері транскрипция (КТ-ПТР) реакциясы көмегімен тексерілді. Рекомбинантты ақуызды L1RA ақуызына арнайы антиденелер көмегімен бірқатар трансгенді өсімдіктерде анықталды.

**Түйін сөздер:** қой шешегі вирусы, трансгенді өсімдік.

ВОО относится к роду *Capripoxvirus*, входящему в обширное семейство *Poxviridae* [1]. ВОО является возбудителем особо опасной болезни мелких жвачных животных, и как следствие, способен наносить большой экономический ущерб. В настоящее время, в Республике Казахстан и других постсоветских странах для профилактики данного заболевания

используется аттенуированный штамм «НИСХИ» [2]. Вакцины, основанные на живых аттенуированных штаммах вирусов потенциально опасны и теоретически способны рекомбинировать с образованием вирулентных штаммов. К тому же, существующие вакцины часто дорогостоящи при производстве.

Новый подход к созданию вакцин состоит в получении трансгенных растений, продуцирующих вирусные белки [3, 4].

Целью нашей работы является получение трансгенных растений для профилактики оспы овец. К настоящему времени установлено, что пять белков вируса оспы человека могут вызывать реакцию нейтрализации антител. К ним относятся H5R, A27L, B5R, D8L, L1R [5]. В качестве объекта нами был выбран белок BOO, представляющий собой ортолог белка L1R.

### Материалы и методы

Последовательность гена *SPPV-NISKHI-56* (738 пн) (GenBank: AY077834) была проанализирована с помощью компьютерной программы DNAMAN (Lynnon BioSoft, USA) на наличие сайтов рестрикции. Аминокислотная последовательность природного белка L1R (GenBank ID: NP\_659632) BOO была проверена на наличие гидрофобных сегментов с использованием компьютерной программы TransMem (GCG Wisconsin Package Program). Также нуклеотидная последовательность была проверена на наличие/отсутствие возможных растительных сайтов сплайсинга с использованием компьютерной программы NetGene2v.2.4 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>).

В пределах белка L1R BOO был идентифицирован один трансмембранный сегмент (рисунок 1).

MGAAASIQTTVNTLNEKISSNLEQTAEATAEA  
KCDIEIGNIVFRQNKGCNVTVKNLCSKAESQLDA  
ILKAATETYDSLTPDQKAYVPLITAALNIQTSVN  
TVVKDFETYVKQKCTSKSVIDNKLKIHNFIDECV  
APTGTTTNFEFINSQGSQGICAIKTLMDVTTKAST  
KFSPSQSSGYGYQFYIIAAVVVILSMVFLYYVKK  
MLFTSTKDKIKIILANKPEVHWTSYLDTFNSNTPTI  
IEK

**Рисунок 1** - Однобуквенная аминокислотная последовательность белка L1R BOO. Трансмембранный сегмент выделен серым

С учетом полученных данных была искусственно синтезирована большая часть гена, включая нуклеотиды с 1 по 564, кодирующая гидрофильный N-концевой сегмент белка (L1RΔ) (рисунок 2). Замены

нуклеотидов не изменяли последовательность аминокислот рекомбинантного белка.

NdeI

CATATGGGAGCAGCCGCAAGTATACAAACT  
ACTGTCAATACTTTAAATGAAAAATAAGTAGT  
AATTTGGAACAACTGCTGAAGCTACTGCGGA  
AGCAAAATGCGATATAGAAATAGGAAATATTG  
TATTTAGACAAAATAAGGGTTGTAATGTTACTG  
TAAAAAACTTGTGTTTCGTCTAAAGCAGAATCTC  
AATTAGATGCCATATTTAAAGCAGCAACAGAA  
ACCTATGATTCACCTACTCTGATCAAAAAGCC  
TATGTTCCAGGATTGATAACAGCGGCATTAAT  
ATCCAAACAAGTGTTAATACTGTGGTTAAAGAT  
TTTGAAACCTATGTAACAACAAAATGTACATCA  
AAATCGGTTATTGATAATAAATTGAAGATTTCAT  
AATATTTTTATTGACGAATGTGTTGCACCAACC  
GGAACAACGACAAAACCTTTGAATTTAATTCT  
GGAACCAGTCAAGGTATATGTGCAATAAAAAC  
GTTAATGGATGTAACCACAAAAGCGAGTACAA  
AATTTTCCCCTAGTCAAAGTTCGGGATACGGAT  
ATCAATTTTATATATAAAGCTCGAG

XhoI

**Рисунок 2** – Синтезированный фрагмент гена *SPPV-NISKHI-56*. Сайты рестрикции выделены серым цветом. Подчеркнутым выделены нуклеотиды, замененные для удаления дополнительных сайтов рестрикции *NdeI* и сайтов сплайсинга в растениях

**Иммуноблотинг.** Электрофорез белков в 15% полиакриламидном геле и иммуноблотинг белков на PVDF мембране проводили по стандартной методике [6]. Для продуктов трансляции клеток *E.coli* использовали конъюгированные с пероксидазой антитела к гистидинового пептиду (His-Tag) (5'Prime), пероксидазную активность выявляли с помощью субстрата – 3,3'-диаминобензидина (Sigma). Для детекции белка в трансгенных растениях в качестве первых антител использовали специфичные к L1R белку поликлональные кроличьи антитела, любезно предоставленные сотрудниками «Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности». В качестве вторых антител использовали антикроличьи антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Sigma). Активность щелочной фосфатазы выявляли с помощью субстрата – Fast Red TR/Naphthol AS-MX (Sigma).

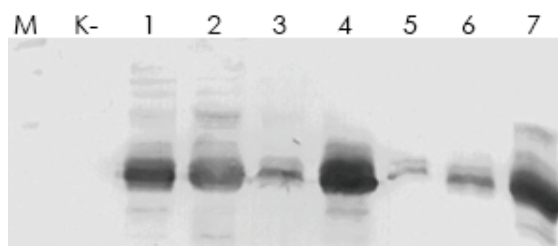
**Трансформация агробактерий.** Клетки *A.tumefaciens* ЕНА101 для электропорации были приготовлены по [7]. Клетки, смешанные

с плазмидами, были электропорированы при помощи GenePulser (BioRad) при 1,8 kV, 25  $\mu$ F, 200 $\Omega$ .

**Трансформация растений и их анализ.** Листовые диски *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun-NN были трансформированы методом кокультивации с агробактериями по [8]. ДНК из листьев табака была выделена по [9]. РНК была выделена с помощью реагента тризол (Sigma). Два листовых диска, вырезанных с помощью крышки эппендорфа, были растерты в 150 мкл буфера (Sigma), дебрис был удален центрифугированием, концентрация белка была измерена по Бредфорду [10]. 50 мкг белка смешивали с образцовым буфером и после прогрева наносили в лунки 15% ПААГ.

#### Результаты и их обсуждение

Искусственно синтезированный фрагмент гена *SPPV-NISKHI-56* (с 1 по 564 нуклеотид) был клонирован в плазмиду pET19b по сайтам рестрикции *NdeI* и *XhoI*. Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli* (штамм Rosetta). Индукцию экспрессии белка L1R $\Delta$  производили в 7 клонах в течении 6 часов при 30 $^{\circ}$ C. Результат иммуноблотинга изображен на рисунке 3.

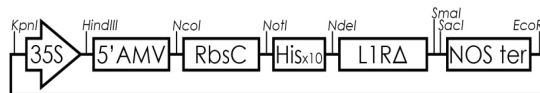


М – белковый маркер; К- - клетки бактерий не трансформированные рекомбинантной плазмидой; 1-7 клоны бактерий, экспрессирующие белок L1R $\Delta$

**Рисунок 3** – Результат иммуноблотинга белков, выделенных из клеток *E. coli* с антителами к His-Tag

Рекомбинантная агробактериальная ДНК – конструкция, на основе плазмиды pCAMBIA2300, для трансформации растений табака *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun-NN изображена на рисунке 4. Гену белка L1R $\Delta$  предшествует последовательность сигнального пептида малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы для специфического направления синтезированного белка в хлоропласты клетки. Белок

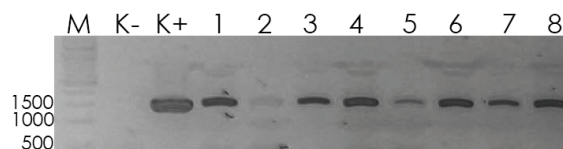
кодирующая последовательность находится под контролем 5' нетранслируемой последовательности (НТП) геномной РНК (гРНК) вируса мозаики люцерны (AMV).



35S – промотор вируса мозаики цветной капусты; 5' AMV - 5' НТП гРНК AMV; RbsC – ген сигнального пептида; Hisx10 – His-Tag; L1R $\Delta$  – нуклеотидная последовательность N-концевого фрагмента белка L1R; NOS ter – терминатор транскрипции нопалинсинтетазы

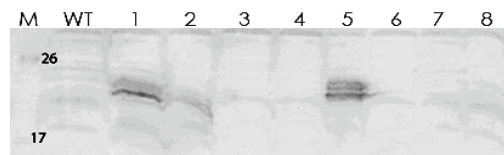
**Рисунок 4** – Агробактериальная ДНК - конструкция

8 растений – регенерантов, содержащие вставку гена *SPPV-NISKHI-56* и образовавшие корни на среде с канамицином, были проанализированы с помощью ОТ-ПЦР на наличие соответствующей мРНК (рисунок 5). Далее из 8 анализируемых растений – регенерантов были выделены белки. Результат иммуно-блотинга показал наличие рекомбинантного белка L1R $\Delta$  в трансгенных растениях №1 и №5 (рисунок 6).



М – ДНК маркер; К- - ОТ-ПЦР с мРНК, выделенной из растения дикого типа; К+ – положительный контроль; 1-8 растения – регенеранты, образовавшие корни на среде с канамицином

**Рисунок 5** – Результат ОТ-ПЦР



М – белковый маркер; WT – дикий тип; 1-8 растения – регенеранты

**Рисунок 6** – Иммуноблотинг белков, выделенных из растений, с антителами специфичными к белку L1R $\Delta$

### Литература

- 1 Tulman E.R., Alfonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur J.-H., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L. The Genomes of Sheeppox and Goatpox Viruses // *Journal of Virology*. – 2002. - 76(12), - 6054-6061.
- 2 Орлова Е.С. Совершенствование методов диагностики оспы овец и оспы коз. – Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Владимир, 2007. – 6 с.
- 3 Giddings G. Transgenic plants as protein factories // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2001. - 12, - 450–454.
- 4 Daniell H., Streatfield S., Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // *Trends in Plant Sci.* – 2001. – V. 6. – P. 219-226.
- 5 Hooper J.W., Custer D.M., Schmaljohn C.S., Schmaljohn A.L. DNA vaccination with vaccinia virus L1R and A33R genes protects mice against a lethal poxvirus challenge // *Virology*. – 2000. – V. 266. – P. 329–339.
- 6 Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. - 3rd ed. - CSHL Press: New York, USA, 2001. - pp. A8.40-A8.45, A8.52-A8.55.
- 7 Shen W.J., Forde B.G. Efficient transformation of agrobacterium spp by high-voltage electroporation // *Nucleic Acids Research*. – 1989. – V. 17. – P. 8385.
- 8 Horsch R.B., Rogers S.G., Fraley R.T. Transgenic plants // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. – 1985. – V. 50. – P. 433-437.
- 9 Dilworth E., Frey J.E. A rapid method for high throughput DNA extraction from plant material for PCR amplification // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 2000. – V. 18(1). – P. 61-64.
- 10 Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.