

И.Т. Сmekenov* , Т.М. Райке , С.В. Тилвалдиева 

НАО «Казахский национальный университет им. аль-Фараби», Казахстан, г. Алматы

*e-mail: smekenovizat@gmail.com

ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К РЕКОМБИНАНТНОМУ ГОМОЛОГУ LST8/GβL *TRITICUM* *AESTIVUM*, КОМПОНЕНТУ TORC1 СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

LST8 является ключевым компонентом TOR сигнальной системы, центрального регулятора клеточной пролиферации и роста эукариотических клеток. В этом исследовании получены и охарактеризованы поликлональные антитела против LST8 *Triticum aestivum* (TaLST8). Выделен кДНК, кодирующая полный белок TaLST8. Выравнивание аминокислотной последовательности TaLST8 показало высокую гомологию с LST8 дрожжей (55% идентичность), LST8 человека (51% идентичность) и AtLST8 арабидопсиса (85% идентичность). Для получения антител против TaLST8, высококонсервативная часть гена TaLST8, кодирующая белок, состоящий из 150 аминокислот (talst8/150), была клонирована в pET-28c с гистидиновым концом (6xHis) и экспрессирована в *Escherichia coli*. Кроликов иммунизировали очищенным рекомбинантным белком TaLST8/150. Полученные антисыворотки очищали для повышения специфичности распознавания. Чувствительность и специфичность продуцируемых антител анализировали с помощью иммуноферментного анализа, иммуноблоттинга и иммунодот анализа. Иммуноферментный анализ показал, что иммунизация очищенным белком 6xHis-TaLST8/150 продуцировал поликлональные антитела с высоким титром (1:64000) и высокой специфичностью. Антитела против TaLST8 позволили специфичному выявлению нативного и денатурированного белка в иммуноблоттинг и иммунодот анализе.

Очищенные поликлональные антитела, полученные против рекомбинантного белка TaLST8/150, достаточно специфичны и чувствительны и могут быть полезным инструментом для будущего изучения функционирования TOR сигнальной системы в растениях пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, LST8, экспрессия белка, поликлональные антитела, иммуноферментный анализ.

I.T. Smekenov*, T.M. Raike, S.V. Tilvaldieva

NON-PROFIT JSC «Al-Farabi Kazakh National University», Kazakhstan, Almaty

*e-mail: smekenovizat@gmail.com

Polyclonal polyclonal antibodies to the recombinant LST8/GβL homologue of *Triticum aestivum*, a component of the TORC1 signaling

LST8 is a key component of the TOR signaling system, a central regulator of cell proliferation and growth in eukaryotic cells. In this study, polyclonal antibodies against LST8 of *Triticum aestivum* (TaLST8) were produced and characterized. cDNA of the wheat TaLST8 was isolated by reverse transcription-PCR. The amino acid sequence alignment of TaLST8 showed high homology with yeast LST8 (55% identity), human LST8 (51% identity), and Arabidopsis AtLST8 (85% identity). To obtain antibodies against TaLST8, a highly conserved part of the TaLST8 gene encoding a 150 amino acid protein (talst8/150) was cloned into pET-28c with a histidine tag (6xHis) and expressed in *Escherichia coli*. Rabbits were immunized with purified TaLST8/150 recombinant protein. The obtained antisera were purified to increase the specificity of recognition. The sensitivity and specificity of the produced antibody was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting and immunodot assay. Enzyme-linked immunosorbent assay showed that immunization with purified 6xHis-TaLST8/150 produced the high titer (1:64000) polyclonal antibodies with high specificity. Antibodies against TaLST8 allowed the sensitive detection of native and denatured protein in Western blot and immunodot assays.

The purified polyclonal antibody raised against the recombinant TaLST8/150 protein is sufficiently specific and sensitive and could be a useful tool for future insights of the functioning of the TOR signaling system in wheat plants.

Key words: *Triticum aestivum*, LST8, protein expression, polyclonal antibodies, enzyme immunoassay.

И.Т. Сметенов*, Т.М. Райке, С.В. Тилвалдиева

«Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті» КЕАК, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: smekenovizat@gmail.com

TORC1 сигналды жүйесінің компоненті *Triticum aestivum* рекомбинантты LST8/GβL гомологына поликлоналды антиденелер алу

LST8 – эукариот клеткаларының пролиферациясы мен өсуінің негізгі реттеушісі болып табылатын TOR сигналдық жүйесінің негізгі компоненті. Бұл жұмыста бидайдың LST8 (TaLST8) белогына спецификалық поликлоналды антиденелер алынды және оларға сипаттама берілді. Толық TaLST8 белогының қДНК гені кері транскриптаза негізіндегі ПТП арқылы бөлініп алынды. TaLST8 аминқышқылдарының реттілігін талдау, оның ашытқы (55% сәйкестік), адамның (51% сәйкестік) және арабидописис өсімдігінің (85% сәйкестік) LST8 белоктарымен жоғары гомологияны көрсететіндігі анықталды. TaLST8-ге қарсы антиденелерді алу үшін, 150 аминқышқылынан тұратын белокты кодтайтын TaLST8 генінің жоғары деңгейдегі консервативті бөлігін (talst8/150) pET-28с векторына клондадық. Қояндар тазартылған рекомбинантты TaLST8/150 белогымен иммунизацияланды. Алынған антисарысу, антиденелердің спецификалылығын арттыру үшін аффиндік жолмен тазартылды. Өндірілген антиденелердің спецификалылығы иммуноферменттік талдау, иммуноблоттинг және иммунодоттық зерттеу арқылы талданды. Иммуноферменттік талдау, тазартылған 6xHis-TaLST8/150 белогы негізінде иммунизациялау, жоғары титрлі (1:64000) және спецификалық дәрежесі жоғары поликлоналды антиденелердің пайда болуына алып келді. TaLST8-ге қарсы антиденелер иммуноблоттинг және иммунодоттық талдауларда денатурацияланбаған және денатурацияланған белокты нақты анықтауға мүмкіндік беретінін көрсетті.

Рекомбинантты TaLST8/150 белогына қарсы алынған тазартылған поликлоналды антиденелер айтарлықтай спецификалық көрсетті және болашақта бидай өсімдіктеріндегі TOR сигналдық жүйесінің қызметін түсіну бағытында пайдалы құрал болуы мүмкін.

Түйін сөздер: *Triticum aestivum*, LST8, протеин экспрессиясы, поликлоналды антиденелер, иммундық-ферменттік талдау.

Введение

Мишень рапамицина (Target of rapamycin, TOR) представляет собой эволюционно консервативную протеинкиназу, которая служит как центральный регулятор роста клеток. В присутствии необходимых питательных веществ TOR способствует росту клеток, активируя анаболические процессы, такие как синтез белка и биогенез рибосом, а также подавляет катаболические процессы, такие как аутофагия [1, 2]. У дрожжей и животных TOR присутствует по крайней мере в двух структурно и функционально различных мультибелковых комплексах TORC1 и TORC2. TORC1 состоит из трех основных белков: TOR, KOG1/RAPTOR и LST8/GβL, тогда как TORC2 состоит из TOR, LST8/GβL и AVO3/RICTOR [3-5]. Наряду с TOR киназой, небольшой белок LST8/GβL молекулярной массой 34 кДа является единственным общим компонентом обоих комплексов.

LST8 был впервые идентифицирован у дрожжей в ходе скрининга мутаций, проявляющих синтетические летальные взаимодействия с аллелями *sec13* гена, который участвует в транспорте белков из эндоплазматического ретикула к аппарату Гольджи, а также необходим для

транспорта Gap1 пермеазы аминокислот от аппарата Гольджи к поверхности плазматической мембраны [6]. Белок LST8 состоит из нескольких WD40 повторов длиной приблизительно 40 аминокислот, которые участвуют в различных клеточных процессах, таких как передача сигнала и везикулярный транспорт [7]. WD повторы в LST8 приводят к формированию стабильной пропеллер подобной платформы, позволяющей взаимодействовать с несколькими белками-партнерами [8].

Показано, что мутантные по гену *lst8* дрожжи сверхчувствительны к рапамицину, ингибитору функций TORC1, и имеют дефекты клеточной стенки. В клетках животных белок mLST8 связывается с киназным доменом и активирует TOR киназу и, по-видимому, необходим для поддержания взаимодействия TOR-RAPTOR комплекса TORC1 в зависимости от наличия питательных веществ [4, 9].

Недавно было также показано, что mLST8 взаимодействует с киназой IкappaB и ингибирует фосфорилирование этой киназы путем привлечения PP2A и PP6 фосфатаз [10]. У мышей было продемонстрировано, что эмбрионы с делецией гена mLST8, выживают в течение некоторого времени и умирают из-за дефектов развития сосудов плода [11].

Геном арабидопсиса содержит один ген TOR (AtTOR) [12], два гена RAPTOR [13-17] и два гена LST8 [18]. Мутация с нокаутом гена TOR у *Arabidopsis* является летальной для эмбрионов [12]. Генетические исследования гомозиготных линий арабидопсиса по мутации в гене LST8-1 показало, что отсутствие этого гена приводит к замедлению вегетативного роста и преимущественному развитию верхушечной почки, и тормозило рост боковых почек [18]. При этом наблюдалось отклонения в развитии цветка. Кроме этого, мутантные растения проявляли значительную чувствительность к продолжительности светового дня и содержали более высокие концентрации крахмала и аминокислот, включая пролин и глютамин. У мутантных растений наблюдались низкие концентрации инозита и рафинозы. Следовательно, представляется вероятным, что белок LST8-1 играет в растениях важную роль в регуляции уровня аминокислот и синтеза миоинозита и рафинозы во время адаптации растений к длительному световому дню.

Гексаплоидная пшеница (AABBDD) является основной продовольственной культурой и является источником пищи для более чем 40% мирового населения [19]. Несмотря на экономическое значение пшеницы и необходимость ускоренного улучшения сельскохозяйственных культур на основе исследований геномики, сложность их геномов по сравнению с геномами других культур часто считалась слишком сложной для эффективных молекулярных исследований [20]. Однако, несмотря на прогресс в секвенировании полного генома пшеницы (IWGSC RefSeq v1.0), сам белок TOR и основные компоненты TORC1 сигнальной системы в пшенице все еще не обнаружены. Следовательно, компоненты и функционирование TOR-сигнальной системы у злаков практически не исследованы.

В этом исследовании впервые была выделена кДНК ген LST8/GβL пшеницы и экспрессирован в *E. coli*. Получены поликлональное антитела с использованием рекомбинантного белка в качестве антигена, и специфичность поликлональных антител анализирован с помощью дот-иммуноблоттинга, вестерн-блот гибридизации и иммуноферментного анализа.

Материалы и методы исследования

Растительный материал

Сорт пшеницы Казахстанская 19 получен из отдела генофонда полевых культур Казахского научно-исследовательского института сельско-

го хозяйства и растениеводства, г. Алматы, Казахстан.

Синтез кДНК гена *TaLST8*

Выделение тотальной РНК проводили с использованием 100 мг свежих 2–3 дневных проростков (*Triticum aestivum*) сорта Казахстанская 19 с использованием реагента TRIzol (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Выход и чистоту нуклеиновых кислот (НК) определяли спектрофотометрический при помощи nanodrop 2000с. Качественный анализ проводили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Интактность и качество РНК подтверждалось присутствием двух интенсивных полос 28S и 18S рибосомной РНК в агарозных гелях, визуализированных в УФ-свете.

кДНК ген, кодирующий предполагаемый TaLST8 пшеницы (KAF7052037.1), был идентифицирован по ее гомологии с LST8/GβL человека (LST8, каталожный номер – NP_001186102.1) и арабидопсиса (LST8, каталожный номер – NP_188442.1). Праймеры, использованные для ОТ-ПЦР, приведены в таблице 1. ОТ-ПЦР-амплификацию фрагмента кДНК TaLST8 размером 951 п.н. проводили с использованием Dir_LST8_NdeI и Rev_LST8_EcoRI в качестве прямого и обратного праймеров соответственно. ПЦР проводили с Taq ДНК-полимеразой (Promega, Мэдисон, WI 53711 США). Полученные продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле и визуализировали путем окрашивания бромидом этидия.

кДНК первой цепи синтезировали обратной транскрипцией из 5 мкг общей РНК в качестве матрицы в следующих условиях: обратная транскриптаза RevertAid M-MuLV 200 ед. (Thermo Scientific, Литва), 0,5 мкг праймера олиго-dT₁₈ и 1 мкМ dNTP в конечном объеме 20 мкл. Аликвота кДНК первой цепи служила в качестве матрицы в ПЦР для синтеза второй цепи кДНК, а последующая амплификация двухцепочечной кДНК была выполнена с помощью ген-специфичных праймеров. Ампликоны разделяли электрофорезом в 1% -ном агарозном геле, и продукт ожидаемого размера экстрагировали из геля с помощью набора DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Литва). Полный фрагмент клонировали в вектор pBluescript II SK (+) по сайтам рестрикции NdeI и EcoRI с помощью набора для быстрого лигирования ДНК (Thermo Scientific, Литва), и продукт лигирования трансформировали в компетентные клетки DH5α *E. coli*. Колонии

E. coli, несущие плазмиду со вставкой, подвергали скринингу путем комплементации гена *lacZ*, и плазмидные ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Литва). Наличие вставки в выделен-

ных плаزمидах подтверждали с помощью ПЦР с ген-специфическими праймерами, а ее последовательность подтверждали секвенированием в обоих направлениях с прямым и обратным праймерами M13.

Таблица 1 – Праймеры для ПЦР

Праймеры	Последовательности ДНК
Dir_LST8_NdeI	5'- CGGACCATATGGCTCAACCTTCTGTCAATTC -3'
Rev_LST8_EcoRI	5'- ATCCAGAATTCTTATGAGGGTGCCGATTCAGC -3'
Dir_Lst8_Ab	5'- GAATTCgaATGGCTCAACCTTCTGTCA -3'
Rev_Lst8_Ab	5'- CTCGAGAGCTGCCAAATCCCA -3'

Экспрессии гена TaLST8/150 в бактериальных клетках и их хроматографическая очистка

Клонирование N-концевой части кДНК гена размером 450 п.н. проводили с помощью ПЦР с праймерами Dir_Lst8_Ab и Rev_Lst8_Ab (таблица 1). Амплифицированные фрагменты *TaLST8* клонировали в вектор в рЕТ-28с по *EcoRI* и *XhoI* сайтам рестрикции. Полученная в результате экспрессионная плаزمида рЕТ-28с- *talst8/150*, продуцировала гибридный белок с 6xHis-tag-последовательностью на N-конце. Белок TaLST8/150 очищали из штамма ArcticExpress (DE3) *E. coli*. Трансформированные клетки *E. coli* выращивали в среде LB до $OD_{600} = 0.6$ при 37 °С, а затем индуцировали их экспрессию внесением 50 μ М изопропил-D-1-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) и инкубацией клеток в течение ночи при 13 °С.

Бактерии собирали центрифугированием и осадок лизировали с использованием ультразвука Omni Ruptor 4000 (Omni Inc.), содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА (pH 8,0), 5 % глицерина, 1 мМ DTT и 0,5 % NP-40, ингибиторы протеаз (Roche Diagnostics, Швейцария). Лизаты очищали центрифугированием при 16000 rpm в течение 60 мин при 4 °С, полученный супернатант разбавляли до 500 мМ NaCl и 10 мМ имидазола и наносили на колонку HisTrap HP column (GE Healthcare), заряженную Ni^{2+} . Очищенные образцы белка хранили при -20 °С в 50 % глицерине. Гомогенность белковых препаратов была подтверждена ДСН-ПААГ электрофорезом.

Получение поликлональных антител против TaLST8

Поликлональные антитела против TaLST8 были индуцированы против неполного 6xHis-меченного рекомбинантного белка TaLST8/150. Для первичной иммунизации мы подкожно вводили приблизительно 0,5 мг очищенного белка, смешанного с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (F5881, Sigma-Aldrich, Канада), в пять точек на спинной части каждого кролика. Затем реиммунизацию проводили трижды по 1 мл раствора, содержащего 0,5 мг очищенного белка в 0,5 мл элюирующего буфера и 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда (F5506, Sigma-Aldrich, Канада) с 14-дневным интервалом. Через одну неделю после последней инъекции собирали кровь и к 3 мл полученной кроличьей антисыворотке добавляли сульфат аммония для достижения 50 % насыщения. Осадок собирали центрифугированием, растворяли в очищенной воде и подвергали диализу против 10 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,0). Полученную фракцию иммуноглобулина наносили на колонку с гранулами протеин А агарозы, уравновешенную указанным выше буфером. После промывки тем же буфером антитела элюировали с 100 мМ глициновым буфером (pH 3,0). Фракции, содержащие IgG, объединяли, и pH доводили до 7,0 с помощью 1,0 М трис-основания. Полученную суспензию хранили при 4 °С.

Определение титра антисыворотки с помощью метода ИФА

Титры антисыворотки определяли непрямой иммуноферментным анализом (ИФА). Каж-

дую лунку 96-луночного планшета для ИФА (Corning Inc., США) покрывали 1 мкг рекомбинантного белка (rTaLST8), растворенным в 100 мкл 50 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,6), путем инкубации в течение ночи при 4°C. После трех промывок фосфатно-солевым буфером (PBS) с твин-буфером (PBST; 0,05 % Tween 20 в PBS, рН 7,4), лунки блокировали 100 мкл 3 % BSA растворенного в PBST в течение 1 ч при 37°C, а затем снова дважды промыли с PBST. После блокировки 100 мкл серийно-разведенной сыворотки против TaLST8/150 (от 1:1000 до 1:128000) добавляли в лунки, покрытые антигеном. Планшет покрывали липкой пластиковой пленкой и инкубировали 2 ч при комнатной температуре, а затем четыре раза промывали с PBST. На следующем этапе добавляли козы антитела против кроличьего IgG с разведением 1:30000, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Sigma, Канада), в количестве 100 мкл/лунку и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После промывки в каждую лунку добавляли 100 мкл свежеприготовленного раствора п-нитрофенилфосфата (субстрата) и планшет инкубировали при комнатной температуре в темном месте. Оптическую плотность измеряли при 405 нм (A_{405}) на планшетном ридере Multiskan FC (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Титр антител определяется как максимальное разведение антисыворотки, при котором соотношение A_{405} (A_{405} сыворотки после иммунизации/ A_{405} сыворотки перед иммунизацией) составляет >2:1. Все образцы тестировали трижды, причем каждый планшет содержал контрольные лунки с положительными образцами сыворотки и контрольные лунки с отрицательной контрольной сывороткой.

Дот-блоттинг

Для дот-блоттинга 1,0 мкг каждого белкового препарата наносили каплями на сухую поливинилдифторидную мембрану (Pierce PVDF Transfer Membrane) и сушили. Мембраны блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в 1х солевом буфере, содержащего Tween 20 (TBST; 50 мМ Трис-НСl рН 7,6, 150 мМ NaCl, 0,005 % Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого мембраны инкубировали в блокирующем буфере, содержащем анти- TaLST8 (разведение 1:10000 в блокирующем растворе с 0,1 % Tween 20) или поликлональные антитела против AtARP (разведение 1:5000 в блокирующем растворе с 0,1 % Tween 20) на качалке в течение ночи при 4°C. Затем мембраны трижды

промывали 1×TBST и инкубировали с козыми антикроличьими антителами (ab6702, Abcam, Кембридж, Великобритания) в разведении 1:20000 на качалке в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем каждую мембрану промывали пять раз в 10 мл 1×TBST по 5 мин каждый раз. Для выявления сигнала на пленке Kodak X-Omat (Carestream Health, США) использовался набор реагентов ECL (Bio-Rad, США). Белок TaLST8, меченный 6xHis, также был выявлен с помощью анти-His антителами (разведение 1:1000; sc-803; Santa Cruz Biotechnology, Техас, США), и антителами Ig кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:10000).

Экстракция растительного белка и вестерн-блоттинг

Зародыши пшеницы из 6-7-дневных проростков гомогенизировали в жидком азоте, а затем ресуспендировали в лизис буфере А, состоящем из 50 мМ трис-НСl, 50 мМ β-глицерофосфата натрия (рН 7,6), 25 мМ ЭДТА, 25 мМ EGTA, 50 мМ NaF, 5 мМ Na₃VO₄, 10 % глицерина, 1 % Triton X-100, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид и ингибиторы протеаз, не содержащие ЭДТА (Roche Applied Science, Пенцберг, Германия). Клеточный дебрис осаждали, и концентрацию белка определяли с использованием набора Bradford для анализа белков (Bio-Rad, Франция). Образцы общего белка (25 мкг) из каждого экстракта фракционировали с помощью ДСН-ПААГ в 10 % геле, а затем переносили электроблоттингом на PVDF мембрану с помощью Bio-Rad Minitransblot Cell. После этого мембрану осторожно встряхивали в блокирующем растворе, состоящем из 5 % молока и 0,1 % Tween 20 в 1 × TBS (Солевой трис-буфер: 50 мМ Трис-НСl [рН 7,5] и 20 мМ NaCl) в течение 1 ч при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора мембрану инкубировали в растворе антител против TaLST8 (1:20000) в течение ночи при 4°C. Мембрану промывали пять раз в 10 мл промывочного буфера (1 × TBS с 0,1 % Tween 20) каждый раз по 5 мин. Затем мембрану инкубировали в растворе 10 мл вторичного антитела (разведение 1:30000 в блокирующем растворе с 0,1 % Твина 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембрану промывали пять раз в растворе 10 мл промывочного буфера по 5 мин каждый раз. Раствор рабочего субстрата готовили смешиванием равного объема раствора пероксида и раствора люминала/усилителя и использовали из расчета 0,1 мл/(см² площади блоттинга). Мембрану инкубировали в рабочем

растворе в течение 2 мин в темноте и экспонировали на пленку Kodak X-Omat.

Результаты исследования и их обсуждение

С использованием поисковой системы tBLASTn в базе данных NCBI по гомологии к LST8/GβL человека (LST8, каталожный номер – NP_001186102.1) и арабидопсиса (LST8, каталожный номер – NP_188442.1) идентифициро-

вали κДНК ген, кодирующий предполагаемого LST8 *Triticum aestivum* (TaLST8, каталожный номер – KAF7052037.1) κДНК. TaLST8 содержит одну рамку считывания из 316 аминокислот (рис. 1). Расчетная молекулярная масса составляет 35,3 кДа. Выравнивание аминокислотной последовательности TaLST8 показало высокую гомологию с LST8 дрожжей (55% идентичность), LST8 человека (51% идентичность) и AtLST8 арабидопсиса (85% идентичность) (рис. 1).

HsLST8	MNTSPGTVGSDPVILATAGYDHTVRFWQAHSGICTRTVQHQDSQVNALEVTPDRSMIAAA	60
ScLST8	-----MSVILVSAGYDHTIRFWEALTGVCSTIQHSDSQVNRLEITNDKLLATA	50
TaLST8	-----MAQPSVILATASYDHTIRFWEAKSGRCYRTIQYPPDSQVNRLEITPDKRFLAAA	53
AtLST8	-----MSQPSVILATASYDHTIRFWEAETGRCYRTIQYPPDSHVNRLLEITPKHYLAAA	53
	.:*.*:***:*:* * ***: * **:* **:* **:*	
HsLST8	GYQHIRMVDLNSNPN-IISYDGVNKNIASVGFHEDGRWMTGGEDCTARIWDLRSRNLQ	119
ScLST8	GHQNVRLYDIRTNPNPVASFEGHRGNVTSVVSFQQDNRWMTSSEDGTIKVWDVRSF--S	108
TaLST8	GNSHIRLFDVNSNSPQPVISYDSHTSNVMAVGFHCDGNWMTSGSEDGTVRIWDLRATA--T	111
AtLST8	CNPHIRLFDVNSNSPQPVMTYDSHTNNVMAVGFQCDAKWMTSGSEDGTVKIWDLRAP--G	111
	::*:*:*.:.*: : : : : . * : :*. * : * .** :.:.** * :***:*	
HsLST8	CQRI FQVNAPINCVCVLPHPNQAELIVGDSGAIHIWDLKTDH-NEQLIPEPEVSITSAHID	178
ScLST8	I PRNYKHNAFVNEVVIHPNQGELISCDRDGNIRIWDLGENQCTHQLTPEDDTSLSQLSMA	168
TaLST8	CQREYESRAAVNTVVLHPNQKELISGDQNGNIRVWDLAANSCSCELVPEVDTAIRSLTVM	171
AtLST8	CQKEYESVAAVNTVVLHPNQTELSGDQNGNIRVWDLRANSCSCELVPEVDTAVRSLTVM	171
	: : : * : * * :**** * * * :.* * :*** : . : * ** : : : * :	
HsLST8	PDASYMAAVNSTGNCYVWNL TGGIGDEV TQLIPKTKIPAHTRYALQCRFSPD----STLL	234
ScLST8	SDGSMLAAANTKGCYVWEMPNHT--DASHLKPVTKFRAHSTYITRI LLSSD----VKHL	222
TaLST8	WDGSMVVAANNRGTCTYVWRL LKGTQ-TITSEFPLHKLQAHGDI LKCLLSPEFCDPNRYL	230
AtLST8	WDGTMVVAANNRGTCTYVWRL LRGKQ-TMTEFEPHKLQAHNGH I LKCLLSPA----NKYL	226
	. : :. * . * .****. : : : * * : ** : : : * *	
HsLST8	ATCSADQTCIKWRTS-NFSLMTELSIKSGNPGESSRGWMMWGCAFSGDSQYIVTASSDNLA	293
ScLST8	ATCSADHTARVWSIDDDFKLETTL-----DGHQRWVWDCAFSADSAYLV TASSDHVY	274
TaLST8	ATASSDHTVKIWNVD-GFKLEKTL-----VGHQRWVWDCVFSVDGAYLITASSDTTA	281
AtLST8	ATASSDKTVKIWNVD-GFKLEKVL-----TGHQRWVWDCVFSVDGEFLVTASSDMTA	277
	.*:*. * :.* . .*. * . * . : : * :*. * . * . : : :*** .	
HsLST8	RLWCVETGEIKREYGGHQKAVVCLAFNDSVLG---	325
ScLST8	RLWDLSTREIVRQYGGHHKGAVCVALNDV-----	303
TaLST8	RLWMTSTGEAIRVYQGGHKA TVCCALHDGAESAPS	316
AtLST8	RLWMPAGKEVKVYQGGHKA TVCCALHD-----	305
	*** : : : : * **:*..** * : : *	

Обозначение: Звездочки (*), двоеточий (:), и точки (.) указывают на идентичные, консервативные и полуконсервативные аминокислотные участки, соответственно.

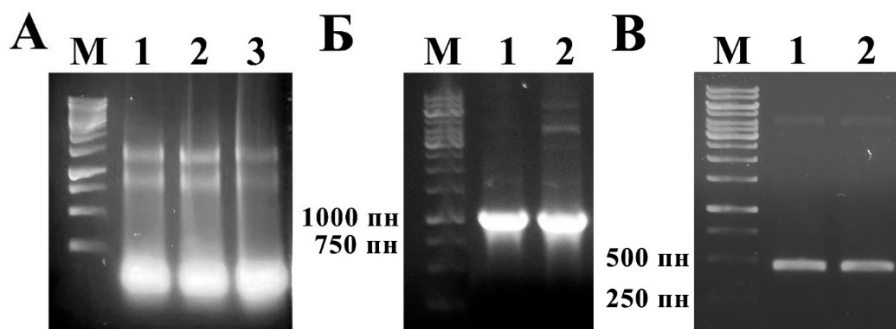
Рисунок 1 – Сравнительное выравнивание аминокислотной последовательности TaLST8 с LST8 человека, *Saccharomyces cerevisiae* и *Arabidopsis thaliana*

В последующих экспериментах мы выделяли κДНК TaLST8 с помощью ОТ-ПЦР (см. раздел «Материалы и методы исследования»). В качестве источника мРНК для реакции ОТ-ПЦР были выбраны листья 2–3 дневных проростков пшеницы. Для этого тотальный препарат РНК выделяли при помощи TRIzol метода,

как описано в разделе методы исследования. Электрофоретический анализ РНК на 0.8% агарозном геле показал наличие 28S рРНК и 18S рРНК (рис. 2А). Далее препарат РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи κДНК с помощью ОТ-ПЦР с использованием 3'-праймера, содержащего олиго(dT₁₈)

последовательность. В последующем кДНК амплифицировали с помощью ПЦР с ген-специфическими праймерами. Из приведенной электрофореграммы (рис. 2Б) видно, что главным продуктом амплификации является кДНК с ожидаемым размером около 971 пар нуклеотидов, что соответствующий длине кДНК гена TaLST8. Далее фрагмент кДНК лигировали с линеаризованным вектором pBluescriptII SK

(+). Продукты лигирования pBluescriptII SK (+)/*talst8* трансформировали в компетентные клетки *E. coli* DH5 α . Затем, плазмиды выделенные из ампициллин устойчивых колоний секвенировали. В результате была получена полная нуклеотидная последовательность кДНК предполагаемого гена TaLST8 длиной 952 пн, что полностью соответствует к предполагаемой открытой рамке считывания TaLST8.



А – Препараты тотальной РНК; Б – Амплификация кДНК гена TaLST8; В – Амплификация N-концевой части кДНК гена TaLST8. Обозначения: М – маркерные ДНК, размеры которых указаны в нуклеотидах слева; 1–3 – образцы.

Рисунок 2 – Амплификация кДНК TaLST8 с помощью ОТ-ПЦР

Если доступно достаточное количество полноразмерного белка, иммунизация полноразмерным белком в форме нативного, рекомбинантного или слитого может быть удобным и экономически эффективным вариантом. Одной из характеристик больших молекул антигенов является то, что они вызывают активацию множества продуцирующих антитела клонов В-клеток. Использование полноразмерного рекомбинантного белка в качестве антигена для получения антител является эффективным вариантом. Поликлональная смесь полученных антител может затем распознавать несколько эпитопов на антигене. В результате существует очень высокая вероятность того, что антитела по крайней мере против одного из этих эпитопов будут связываться с нативным белком в целевом анализе. Однако, недостатком этого подхода является то, что, поскольку антитела генерируются против нескольких эпитопов, существует более высокая вероятность того, что антитела против некоторых из этих эпитопов могут распознавать другие белки, содержащие гомологичные эпитопы. Иммунизация с последовательностью, соответствующей конкретной области полноразмерного белка может привести к генерации антител против вы-

бранных высоко консервативной части белкового антигена [21].

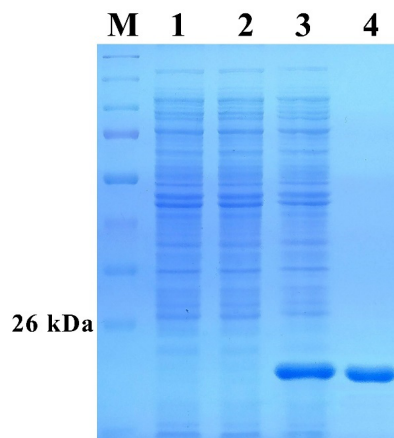
В связи с этим мы в дальнейших исследованиях решили использовать в качестве антигена высоко консервативную часть TaLST8, состоящей из 150 аминокислот (*talst8/150*). Для этого с использованием в качестве матрицы рекомбинантной плазмиды pBluescriptII SK (+)/*talst8*, нами была амплифицирована часть гена TaLST8, кодирующая белок, состоящий из 150 аминокислот начиная с N-конца, с применением комбинации праймеров Dir_Lst8_Ab и Rev_Lst8_Ab (рис. 2В; таблица 1), содержащие сайты рестрикции *EcoRI* и *XhoI* соответственно. Продукт ПЦР использовали, обозначенный нами как *talst8/150* для последующего клонирования в вектор pET-28с. Для этого ПЦР продукт был обработан соответствующими сайтами рестрикции и элюированы из агарозного геля и клонированы в вектор pET-28с.

Наиболее широко используемые рекомбинантные системы для получения иммуногенных антигенов – это гибридные белки, меченные глутатион-S-трансферазой (GST) [22]. Тем не менее, у некоторых животных есть антитела, реагирующие с частью GST гибридного белка; следо-

вательно, все полученные антисыворотки необходимо проверять не только на рекомбинантный антиген, но и отдельно на GST. Полигистидиновая метка широко и предпочтительно используется для получения рекомбинантного иммуногена из-за ее низкой иммуногенности и довольно слабого влияния на функцию или активность белка [23]. Поэтому мы решили использовать систему экспрессии с гистидиновой меткой для получения рекомбинантного TaLST8/150 белка. Вектор для экспрессии гена *talst8/150*, кодирующий 6xHis-метку на N-конце белка, был сконструирован, как описано в разделе «Материалы и методы исследования». Плазмида, экспрессирующая клонированный ген *talst8/150*, была обозначена как pET-28c-*talst8/150*. Для достижения сильных иммунологических ответов против TaLST8/150 желательнее экспрессировать его как хорошо растворимый белок. С целью улучшения растворимости рекомбинантного белка сначала были протестированы три экспрессионных штамма *E. coli*: BL21(DE3), Rosetta-gami 2(DE3) и ArcticExpress(DE3).

Плазмиду pET-28c-*talst8/150* трансформировали в клетки *E. coli* с последующим культивированием стандартным способом, описанным в разделе «Материалы и методы исследования». Экспрессию белка анализировали методом ДСН-ПААГ. Общее количество белка, продуцируемого штаммами *E. coli* BL21(DE3) и Rosetta-gami 2(DE3), было ниже, и интересующий белок оставался в основном в нерастворимой фракции. Поэтому эти компетентные клетки не использовались в дальнейших экспериментах. Наиболее растворимая форма белка была достигнута при экспрессии в компетентных клетках *E. coli* Arctic Express (DE3). С точки зрения растворимости белка, 16 часов постиндукционной инкубации при 13°C оказались оптимальными для получения наиболее растворимого белка. При анализе ДСН-ПААГ одна мажорная белковая полоса с молекулярной массой около 21,9 кДа выявила основное различие между лизатами бактериальных клеток индуцированных и неиндуцированных с ИПТГ. Эта полоса отчетливо появлялась после индукции во всех выбранных клонах, несущих *talst8/150* (рис. 2, дорожка 3). Белок TaLST8/150, слитый с 6xHis-меткой на N-конце, очищали от лизата бактериальных клеток с помощью аффинной хроматографии на колонке HisTrap HP объемом 1 мл (GE Healthcare). Рекомбинантный белок TaLST8/150, выглядел в виде полосы (после очистки с помощью аффинной хроматографии и ДСН-ПААГ) с приблизительной молеку-

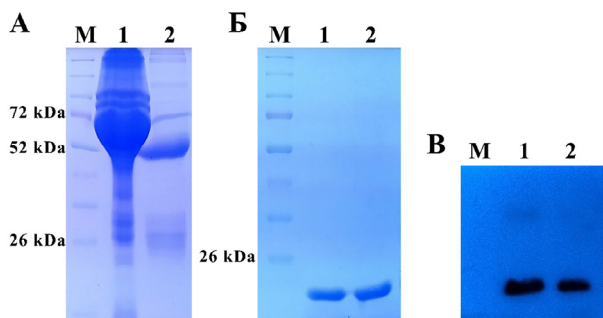
лярной массой 21,9 кДа (рис. 3, дорожка 4). Выход рекомбинантного белка 6xHis- TaLST8/150 составил 4 мг на литр бактериальной культуры.



Обозначена: М – Стандартный белковый молекулярный маркер; 1 – Белковый лизат из нетрансформированных клеток *E. coli*; 2 – Белковый лизат *E. coli* до индукции; 3 – Лизат тех же клеток после индукции с ИПТГ; 4 – Очищенный белок TaLST8/150.

Рисунок 3 – Очистка белка TaLST8/150 сорта пшеницы Казахстанская 19

Далее, очищенный белок 6xHis-TaLST8/150 использовали в качестве антигена для получения поликлональных антител против TaLST8/150 пшеницы. После четырехкратной иммунизации кроликов очищенным белком 6xHis-TaLST8/150, поликлональные антитела против TaLST8/150 сначала осаждали различными концентрациями сульфата аммония и затем очищали на колонке с протеином А-агарозой, следуя инструкциям производителя. Очищенные антитела показали высокую чистоту и состояли из двух полос: одна представляла собой тяжелую цепь (~ 50 кДа), а другая – легкую цепь (~ 25 кДа), по анализу с помощью ДСН-ПААГ в 10% геле (рис. 4А, дорожка 2). Титры полученных антисывороток к TaLST8 тестировали с помощью непрямого ELISA метода. Результаты ELISA показали, что титр очищенных поликлональных антител против TaLST8 составляет 1:64000, что позволяет предположить, что очищенные поликлональные антитела имеют хорошую чувствительность к TaLST8/150 (рис. 5). Титр антител определяется как максимальное разведение антисыворотки, при котором соотношение A_{405} (A_{405} сыворотки после иммунизации/ A_{405} сыворотки перед иммунизацией) составляет >2:1.



А – Очистка кроличьих поликлональных антител. Обозначения: М – стандартный маркер молекулярной массы белков; 1 – сыворотка до очистки, 2 – сыворотка после очистки; **Б** – ДСН-ПААГ очищенного рекомбинантного белка TaLST8/150; **В** – Вестрн блоттинг. Обозначения: 1-2 – образцы.

Рисунок 4 – Очистка и анализ поликлональных антител к TaLST8/150

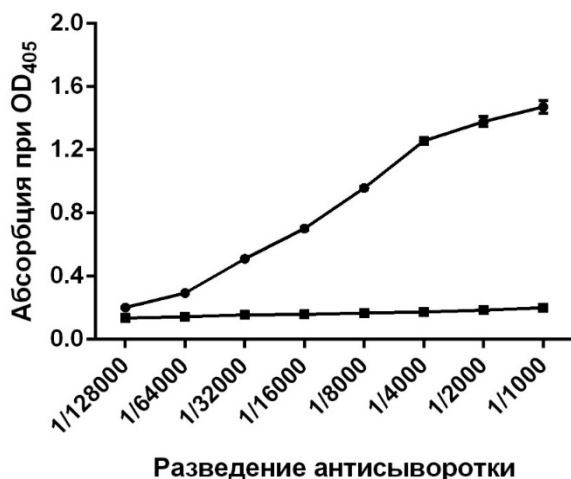


Рисунок 5 – Титр антисыворотки по данным ИФА

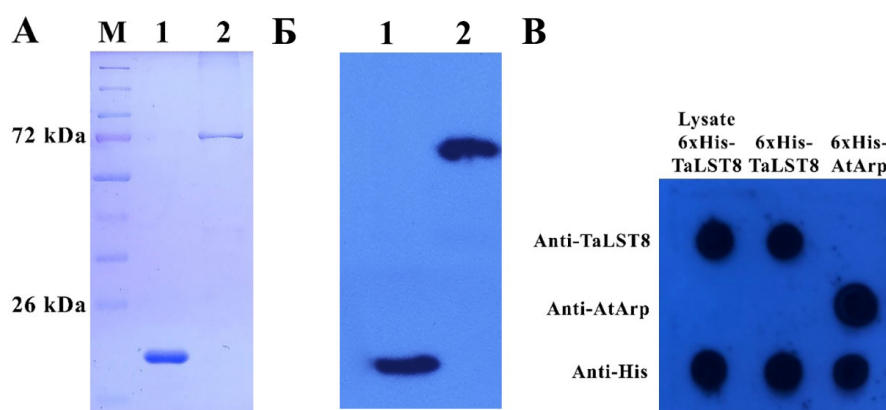
Был проведен вестерн-блоттинг для проверки реактивности и специфичности очищенных поликлональных антител с использованием различных количеств очищенного белка TaLST8/150 (1 и 2 мкг). Очищенная антисыворотка реагировала при различных разведениях (от 1:1000 до 1:30000) с равным количеством соответствующих рекомбинантных белков. В сыворотке кроликов до иммунизации, которая использовалась в качестве отрицательного контроля, не было обнаружено положительного сигнала. Вестерн-блоттинг с антителами против TaLST8/150 выявил интенсивную полосу белка соответствующей молекулярной массе TaLST8/150 (рис. 4В).

Важно проверить, являются ли антитела специфичными к нативному, денатурированному состоянию белка или к денатурированному белку, поскольку денатурирующая обработка образцов белка перед ДСН-ПААГ может изменить доступность эпитопа, тем самым влияя на аффинность антител [24]. Способность, полученных поликлональных антител против TaLST8/150, идентифицировать денатурированные формы TaLST8/150, тестировали с помощью иммунодот анализа с использованием рекомбинантного белка 6xHis-TaLST8/150. Очищенный рекомбинантный белок 6xHis-TaLST8/150, который использовали для иммунизации кроликов, и лизат *E. coli*, содержащий белок 6xHis-TaLST8/150, наносили на мембрану PVDF в виде отдельных точек.

Очищенный рекомбинантный белок AtARP с 6xHis-меткой [25], который был клонирован и помечен так же, как и белок TaLST8/150, был нанесен в качестве отрицательного контроля. Эти контрольные белки также использовали для тестирования специфичности и исключения возможности того, что поликлональные антитела могут узнать и связываться с 6xHis меткой. Очищенные 6xHis-меченные белки TaLST8/150 и AtARP сначала анализировали с помощью ДСН-ПААГ (рис. 6А), а затем с помощью иммунодот-гибридизации (рис. 6В).

Дот-блоты лизата *E. coli*, содержащего 6xHis-TaLST8/150, и очищенного рекомбинантного белка 6xHis-TaLST8/150 давали сильные сигналы с поликлональными антителами анти-TaLST8/150. Дот-блоты контрольного рекомбинантного белка 6xHis-ARP дали отрицательный результат, тогда как антитела анти-6xHis распознали оба белка: 6xHis-TaLST8/150 и 6xHis-ARP. Затем мы оценили способность поликлональных антител анти-TaLST8/150 связывать денатурированные TaLST8/150 белки с помощью вестерн-блоттинга. Поликлональные антитела против TaLST8/150 распознают денатурированный 6xHis-TaLST8/150, но не рекомбинантный белок 6xHis-ARP (рис. 6Б).

Анализ дот-блоттинга и вестерн-блоттинга показал, что антитела против TaLST8/150 распознают как не денатурированный, так и денатурированный белок TaLST8/150. Кроме этого, эти результаты также исключают возможность того, что поликлональные антитела против TaLST8/150 распознают метку 6xHis, которая присутствовала в 6xHis-TaLST8/150 иммуногене, использованного для создания поликлональных антител.



А – ДСН-ПААГ очищенных белков в 10% геле. Обозначения: М – стандартный маркер молекулярной массы белков; 1 – очищенный белок 6xHis-TaLST8; 2 – очищенный белок 6xHis-AtArp; **Б** – Вестерн-блоттинг с поликлональными антителами анти-TaLST8 против денатурированных белков rTaLST8. В Вестерн-блотах 1 мкг очищенного 6xHis-TaLST8 загружали в первую дорожку и 1 мкг очищенного 6xHis-AtArp во вторую дорожку; **В** – Дот-блот-анализ антитела против нативного и рекомбинантного белка 6xHis-TaLST8. Антитела анти-TaLST8, анти-AtArp и анти-His оценивали с помощью дот-блоттинга с очищенными белками 6xHis-TaLST8 и 6xHis-AtArp, а также лизатом клеток *E. coli*, экспрессирующих 6xHis-TaLST8.

Рисунок 6 – ДСН-ПААГ и иммунодот анализ поликлональных антител против TaLST8/150 с помощью нативных и денатурированных белков TaLST8/150.

Таким образом, очищенные поликлональные антитела, полученные против рекомбинантного белка TaLST8/150, достаточно специфично и чувствительно и может быть полезным инструментом для будущего понимания функционирования TOR сигнальной системы в растениях пшеницы.

Заключение

Выделен кДНК ген TaLST8 и экспрессирован в системе *E. coli*. Получены поликлональные антитела против LST8 *Triticum aestivum* (TaLST8) путем иммунизации кроликов с использованием рекомбинантного 6xHis-TaLST8/150 белка. Показано, что поликлональные антитела эффективны в иммуноферментном анализе, иммуноблоттинге и иммунодот исследованиях. Представленные результаты указывают на то, что использование рекомби-

нантного антигена TaLST8/150, генерированного в прокариотической системе экспрессии, не приводит к вариациям в реакциях распознавания антиген-антитело для TaLST8.

Очищенные и охарактеризованные антитела специфичные к TaLST8 может быть полезным инструментом для дальнейших исследований функционирования TOR сигнальной системы в этой очень важной группе растений.

Конфликт интересов

Авторы не имеют конфликтов интересов.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках грантового финансирования Министерства образования и науки Республики Казахстан по проекту AP09259754.

Литература

- 1 Loewith R., Hall M.N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control // *Genetics*. – 2011. – Vol. 189. – P. 1177–1201.
- 2 Saxton R.A., Sabatini D.M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease // *Cell*. – 2017. – Vol. 168. – P. 960–976.
- 3 Hara K., Maruki Y., Long X., Yoshino K., Oshiro N., Hidayat S., Tokunaga C., Avruch J., Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action // *Cell*. – 2002. – Vol. 110. – P. 177–189.

- 4 Kim D.H., Sarbassov D.D., Ali S.M., Latek R.R., Guntur K.V., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Sabatini D.M. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR // *Mol. Cell.* – 2003. – Vol. 11. – P. 895–904.
- 5 Loewith R., Jacinto E., Wullschlegel S., Lorberg A., Crespo J.L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M.N. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control // *Mol. Cell.* – 2002. – Vol. 10. – P. 457–468.
- 6 Roberg K.J., Bickel S., Rowley N., Kaiser C.A. Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST8 // *Genetics.* – 1997. – Vol. 147. – P. 1569–1584.
- 7 Neer E.J., Schmidt C.J., Nambudripad R., Smith T.F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins // *Nature.* – 1994. – Vol. 371. – P. 297–300.
- 8 Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E.J. The WD repeat: A common architecture for diverse functions // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – Vol. 24. – P. 181–185.
- 9 Adami A., Garcí'a-Alvarez B., Arias-Palomo E., Barford D., Llorca O. Structure of TOR and its complex with KOG1 // *Mol. Cell.* – 2007. – Vol. 27. – P. 509–516.
- 10 You D.J., Kim Y.L., Park C.R., Kim D.K., Yeom J., Lee C., Ahn C., Seong J.Y., Hwang J.I. Regulation of Ikb kinase by Gbl through recruitment of the protein phosphatases // *Mol. Cells.* – 2010. – Vol. 30. – P. 527–532.
- 11 Guertin D.A., Stevens D.M., Thoren C.C., Burds A.A., Kalaany N.Y., Moffat J., Brown M., Fitzgerald K.J., Sabatini D.M. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1 // *Dev. Cell.* – 2006. – Vol. 11. – P. 859–871.
- 12 Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C., Robaglia C. Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – Vol. 99. – P. 6422–6427.
- 13 Anderson G. H., Veit B., Hanson M. R. The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth // *BMC Biology.* – 2005. – Vol. 3. – P. 12.
- 14 Deprost D., Truong H. N., Robaglia C., Meyer C. An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2005. – Vol. 326. – P. 844–850.
- 15 Mahfouz M.M., Kim S., Delauney A.J., Verma D.P. Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals // *The Plant Cell.* – 2006. – Vol. 18. – P. 477–490.
- 16 Rexin D., Meyer C., Robaglia C., Veit B. TOR signalling in plants // *Biochemical Journal.* – 2015. – Vol. 470. – P. 1–14.
- 17 Salem M.A., Li Y., Bajdzienko K., Fisahn J., Watanabe M., Hoefgen R., Schottler M.A., Giavalisco P. RAPTOR controls developmental growth transitions by altering the hormonal and metabolic balance // *Plant Physiology.* – 2018. – Vol. 177. – P. 565–593.
- 18 Moreau M., Azzopardi M., Clement G., Dobrenel T., Marchive C., Renne C., Martin-Magniette M.L., Taconnat L., Renou J.-P., Robaglia C., Meyer C. Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GbetaL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days // *The Plant Cell.* – 2012. – Vol. 24. – P. 463–481.
- 19 Giraldo P., Benavente E., Manzano-Agugliaro F., Gimenez E. Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis // *Agronomy.* – 2019. – Vol. 9. – P. 352.
- 20 Gupta P.K., Mir R.R., Mohan A., Kumar J. Wheat Genomics: Present Status and Future Prospects // *Int J Plant Genomics.* – 2008. – Vol. 2008. – P. 896451.
- 21 Bordeaux J., Welsh A.W., Agarwal S., Killiam E., Baquero M.T., Hanna J.A., Anagnostou V.K., Rimm D.L. Antibody validation // *Biotechniques.* – 2010. Vol. 48. – P. 197–209.
- 22 Zanoni R.G., Nauta I.M., Pauli U., Peterhans E. Expression in *Escherichia coli* and sequencing of the coding region for the capsid protein of Dutch maedi-visna virus strain ZZV 1050: application of recombinant protein in enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of caprine and ovine lentiviruses // *J Clin Microbiol.* – 1991. – Vol. 29. – P. 1290–1294.
- 23 Molinkova D. Purification of *Escherichia coli*-expressed HIS-tagged Maedi-Visna p25 core antigen by Ni²⁺-chelate affinity chromatography // *Vet Med-Czech.* – 2001. – Vol. 46. – P. 50–54.
- 24 Bass J.J., Wilkinson D.J., Rankin D., Phillips B.E., Szewczyk N.J., Smith K., Atherton P.J. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research // *Scand J Med Sci Sports.* – 2017. – Vol. 27. – P. 4–25.
- 25 Akishev Z., Taipakova S., Joldybayeva B., Zutterling C., Smekenov I., Ishchenko A.A., Zharkov D.O., Bissenbaev A.K., Saparbaev M. The major Arabidopsis thaliana apurinic/apyrimidinic endonuclease, ARP is involved in the plant nucleotide incision repair pathway // *DNA Repair.* – 2016. – Vol. 48. – P. 430–421.

References

- 1 Adami A., Garcí'a-Alvarez B., Arias-Palomo E., Barford D., Llorca O. (2007) Structure of TOR and its complex with KOG1. *Mol. Cell.*, vol. 27, pp. 509–516.
- 2 Akishev Z., Taipakova S., Joldybayeva B., Zutterling C., Smekenov I., Ishchenko A.A., Zharkov D.O., Bissenbaev A.K., Saparbaev M. (2016) The major Arabidopsis thaliana apurinic/apyrimidinic endonuclease, ARP is involved in the plant nucleotide incision repair pathway. *DNA Repair.*, vol. 48, pp. 430–421.
- 3 Anderson G. H., Veit B., Hanson M. R. (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biology.*, vol. 3, pp. 12.
- 4 Bass J.J., Wilkinson D.J., Rankin D., Phillips B.E., Szewczyk N.J., Smith K., Atherton P.J. (2017) An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports.*, vol. 27, pp. 4–25.
- 5 Bordeaux J., Welsh A.W., Agarwal S., Killiam E., Baquero M.T., Hanna J.A., Anagnostou V.K., Rimm D.L. (2010) Antibody validation. *Biotechniques.*, vol. 48, pp. 197–209.
- 6 Deprost D., Truong H. N., Robaglia C., Meyer C. (2005) An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, vol. 326, pp. 844–850.

- 7 Giraldo P., Benavente E., Manzano-Agugliaro F., Gimenez E. (2019) Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. *Agronomy*, vol. 9, pp. 352.
- 8 Guertin D.A., Stevens D.M., Thoreen C.C., Burds A.A., Kalaany N.Y., Moffat J., Brown M., Fitzgerald K.J., Sabatini D.M. (2006) Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev. Cell.*, vol. 11, pp. 859–871.
- 9 Gupta P.K., Mir R.R., Mohan A., Kumar J. (2008) Wheat Genomics: Present Status and Future Prospects. *Int J Plant Genomics*. vol. 2008, pp. 896451.
- 10 Hara K., Maruki Y., Long X., Yoshino K., Oshiro N., Hidayat S., Tokunaga C., Avruch J., Yonezawa K. (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell.*, vol. 110, pp. 177–189.
- 11 Kim D.H., Sarbassov D.D., Ali S.M., Latek R.R., Guntur K.V., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Sabatini D.M. (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell.*, vol. 11, pp. 895–904.
- 12 Loewith R., Hall M.N. (2011) Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics.*, vol. 189, pp. 1177–1201.
- 13 Loewith R., Jacinto E., Wullschlegel S., Lörberg A., Crespo J.L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M.N. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell.*, vol. 10, pp. 457–468.
- 14 Mahfouz M.M., Kim S., Delauney A.J., Verma D.P. (2006) Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *The Plant Cell.*, vol. 18, pp. 477–490.
- 15 Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C., Robaglia C. (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, pp. 6422–6427.
- 16 Molinkova D. (2001) Purification of Escherichia coli-expressed HIS-tagged Maedi-Visna p25 core antigen by Ni²⁺-chelate affinity chromatography. *Vet Med-Czech.*, vol. 46, pp. 50–54.
- 17 Moreau M., Azzopardi M., Clement G., Dobrenel T., Marchive C., Renne C., Martin-Magniette M.L., Taconnat L., Renou J.-P., Robaglia C., Meyer C. (2012) Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GbetaL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *The Plant Cell.*, vol. 24, pp. 463–481.
- 18 Neer E.J., Schmidt C.J., Nambudripad R., Smith T.F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature.*, vol. 371, p. 297–300.
- 19 Rexin D., Meyer C., Robaglia C., Veit B. (2015) TOR signalling in plants. *Biochemical Journal.*, vol. 470, pp. 1–14.
- 20 Roberg K.J., Bickel S., Rowley N., Kaiser C.A. (1997) Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST8. *Genetics.*, vol. 147, pp. 1569–1584.
- 21 Salem M.A., Li Y., Bajdzienko K., Fisahn J., Watanabe M., Hoefgen R., Schottler M.A., Giavalisco P. (2018) RAPTOR controls developmental growth transitions by altering the hormonal and metabolic balance. *Plant Physiology.*, vol. 177, pp. 565–593.
- 22 Saxton R.A., Sabatini D.M. (2017) mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell.*, vol. 168., pp. 960–976.
- 23 Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E.J. (1999) The WD repeat: A common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.*, vol. 24, pp. 181–185.
- 24 You D.J., Kim Y.L., Park C.R., Kim D.K., Yeom J., Lee C., Ahn C., Seong J.Y., Hwang J.I. (2010) Regulation of I κ B kinase by G β L through recruitment of the protein phosphatases. *Mol. Cells.* vol. 30, pp. 527–532.
- 25 Zanoni R.G., Nauta I.M., Pauli U., Peterhans E. (1991) Expression in Escherichia coli and sequencing of the coding region for the capsid protein of Dutch maedi-visna virus strain ZZV 1050: application of recombinant protein in enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of caprine and ovine lentiviruses. *J Clin Microbiol.*, vol. 29, pp. 1290–1294.