

### Summary

The genetics of specific traits of wheat is analysed. Taxonomic traits by K.Linneey are based on the minor genes and are controlled by very simple gene (1-3 and polymeric) relation. These simple gene relations can't be sufficient criterion for definition of the specific status. From a point allopolyploidy evolution and alteration of fragility of an ear of wild species are the basic systems of formation of species. Wild tetraploid wheat – Emmer has arisen by this way. So, together with a result of long-term researches of interspecific hybrids of wheat, it is offered to include in species of Triticum only seven species: *T.boeoticum*, *T.urartu*, *T.araraticum*, *T.dicoccoides*, *T.timopheevi*, *T.dicoccum*, *T.spelta*. All other species concern to natural cultural ecology-geographical categories - species and subspecies of wheat.

577.217.5:577.218:578.821.2

<sup>1</sup>Надилова Л.Т., <sup>1</sup>Станбекова Г.Э., <sup>2</sup>Червякова О.В., <sup>2</sup>Сандыбаев Н.Т.,  
<sup>2</sup>Султанкулова К.Т., <sup>2</sup>Строчков В.М., <sup>1</sup>Жигайлов А.В., <sup>1</sup>Полиμβетова Н.С.,  
<sup>2</sup>Зайцев В.Л., <sup>1</sup>Искаков Б.К.

### СИНТЕЗ БЕЛКА ВНЕШНЕЙ ОБОЛОЧКИ ВИРУСА ОСПЫ ОВЕЦ В РАСТИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ *in vitro*

(<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина,  
<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности)

*Клонирован кДНК-ген EEV119, кодирующий трансмембранный белок, локализующийся во внешней оболочке вируса оспы овец (SPPV) штамма «НИСХИ». Построены рекомбинантные конструкции «Y-EEV119-TMV» и «ARCx3-EEV119-TMV». В качестве 5'-нетранслируемой последовательности (5'НТП) конструкция «Y-EEV119-TMV» содержала 5'НТП (Y) геномной (э)РНК Y-вируса картофеля (PVY), а конструкция «ARCx3-EEV119-TMV» – три копии 10-нуклеотидной вставки (ARCx3), комплементарной центральному району 18S рРНК пшеницы (нуклеотиды 1113-1122). Были синтезированы *in vitro* соответствующие мРНК, которые транслировали в бесклеточной системе зародышей пшеницы. Показано, что обе конструкции обеспечивают значительный уровень синтеза белка EEV119 SPPV, при этом 5'НТП эРНК PVY обладала наибольшей способностью усиливать синтез белков.*

Получение трансгенных растений – продуцентов вакцин является одним из перспективных направлений генетической инженерии. Исследования последних лет показали, что белки различных микроорганизмов можно успешно производить в растительных системах с сохранением их иммуногенных свойств. При переносе в геном растения чужеродные гены стабильно интегрируются и передаются потомкам. Установлено, что аппарат транскрипции и трансляции у растений является универсальным и может быть адаптирован не только для гомологичных белков, не синтезируемых данным видом растения, но и для синтеза гетерологичных белков бактериального и вирусного происхождения.

Культивирование растений не требует дорогостоящего оборудования, а сельскохозяйственные масштабы продукции гарантируют доступность рекомбинантного препарата в количествах, достаточных для клинических испытаний и широкого иммунопрофилактического использования. В отличие от животных, растительные клетки не содержат в своём составе патогенные для человека и животных вирусы, а также прионы и, таким образом, могут служить безопасным источником рекомбинантных белков лечебного назначения. Хотя стоимость выделения и очистки целевого белка из растений-продуцентов может быть сопоставима с таковой для других систем, наработка сырого материала обходится значительно (в сотни раз) дешевле. В ряде случаев, например, при использовании трансгенных растений в качестве "съедобных вакцин" выделение белка в чистом виде не требуется.

В настоящее время во многих лабораториях мира на основе трансгенных растений разрабатываются вакцины против различных болезней человека и животных [1-3], многие из которых проходят клинические испытания и готовы к практическому использованию [4-6]. В связи с этим особый интерес представляет получение вакцин на основе трансгенных растений против оспы овец.

Целью нашей работы является получение трансгенных растений для профилактики оспы овец (по классификации и номенклатуре вирусов, принятой в Мадриде в 1975 году, вирус оспы овец (SPPV) отнесён к роду *Sarpiroхvигus*, входящему в обширное семейство *Rохviridae* [7]). Для создания "съедобных вакцин" к данному вирусу нами был выбран вирусный белок оболочки EEV119. Прежде чем приступить к созданию трансгенных растений, трансформированных геном *EEV119*, необходимо было проверить, способна ли мРНК этого белка корректно транслироваться в растительных системах под контролем различных (вирусных и искусственных) трансляционных усилителей (энхансеров). В данной работе представлены результаты исследований по синтезу в растительной системе *in vitro* рекомбинантного белка оболочки вируса оспы овец EEV-119.

### Материалы и методы

В работе использовали вирус оспы овец, эпизоотический штамм "А" и вакцинный штамм "НИСХИ". Очистку и концентрирование вируса проводили по комбинированной схеме, отработанной в Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (НИИПББ).

*Полимеразную цепную реакцию (ПЦР)* использовали для амплификации фрагмента гена белка оболочки EEV119 SPPV. Прямой (№1) и обратный (№2) праймеры, содержащие соответственно сайты рестрикции *NcoI* и *XbaI*, были синтезированы в НИИПББ на основе имеющейся нуклеотидной последовательности гена этого белка. Последовательности праймеров даны ниже (полужирным шрифтом указаны вносимые мутации, а курсивом – сайты рестриктаз):

праймер №1 (*NcoI*): 5'GAACTTTAAAC**CCATGG**TAGTTGATGT3'

праймер №2 (*XbaI*): 5'TGTTT**GTCTAG**ATAATGACTTC 3'.

В качестве матрицы использовалась гДНК SPPV. Реакционная смесь объемом 50 мкл имела следующий состав: 10 мМ Трис HCl (pH 8,3); 50 мМ KCl; 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 10 мМ ДТТ; по 200 мкМ каждого из dNTP; 2 мкг гДНК SPPV; 100 ед/мл ДНК-полимеразы Pwo ("Roche") и по 2 мкл олигонуклеотидов №1 и №2. Амплификацию ДНК проводили в следующем температурном режиме:

Стадия 1: 5 мин. 94 °С – 1 цикл.

Стадия 2: 30 сек. 94 °С, 1 мин. 43 °С, 45 сек 72 °С – 30 циклов.

Стадия 3: 5 мин. 72 °С – 1 цикл.

*Конструирование плазмид.* Рекомбинантные конструкции, содержащие ген *EEV119* SPPV, получали с применением стандартных методов генетической инженерии. В качестве исходных ДНК-конструкций использовали полученные ранее конструкции «Y-GUS-TMV» и «(ARCx3)-GUS-TMV», из которых с помощью рестриктаз *NcoI* и *XbaI* выщепляли ген *GUS*, кодирующий β-глюкуронидазу, и лигировали по этим же сайтам рестрикции ДНК-фрагмент, соответствующий кодирующей области гена белка внешней оболочки SPPV EEV119.

*Транскрипцию in vitro* с использованием РНК-полимеразы фага Т7 проводили по модифицированной методике Гуревича [8]. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 250 мМ Перес-КОН (pH 7,5), 30 мМ Mg(Ас)<sub>2</sub>, 40 мМ ДТТ, 2 мМ спермина, по 7 мМ каждого из рибонуклеозидтрифосфатов, 2 ед/мкл ингибитора рибонуклеаз (RNAsin), 1 ед/мкл Т7 РНК-полимеразы и 0,4 мкг соответствующей ДНК-конструкции, предварительно линеаризованной рестриктазой *EcoRI*.

*Трансляция in vitro* проводилась в бесклеточной системе синтеза белка из зародышей пшеницы сорта "Казахстанская 4", выделенной по методике, описанной ранее [9]. Реакционная смесь объемом 25 мкл имела следующий состав: 20 мМ Трис-Ас (pH 7,6), 90 мМ КАс, 2,0 мМ Mg(Ас)<sub>2</sub>, 1 мМ АТР, 0,1 мМ GTP, 10 мМ креатинфосфата, 0,12 мг/мл креатинфосфокиназы, 0,1 мМ спермидина, по 0,1 мМ всех аминокислот кроме метионина, 0,1 мМ радиоактивного [<sup>35</sup>S] L-метионина (74000 Вq), 1 мкг РНК-конструкции и 11 мкл экстракта из зародышей пшеницы. Реакционную смесь инкубировали в течение одного часа при 26°С. Эффективность трансляции определяли по способности новосинтезированных полипептидов включать радиоактивный метионин посредством автордиографии полиакриламидных гелей после электрофоретического анализа.

*Электрофорез белков* в 15% полиакриламидном геле проводили по стандартной методике [10]. После окончания электрофореза гели вымачивали в 10% глицерине и сушили на сушилке для гелей. Высушенные гели анализировали автордиографией на рентгеновскую пленку.

*Иммуноблоттинг* использовали для детекции рекомбинантного белка в реакционных смесях после окончания реакции трансляции *in vitro*. По окончании электрофореза осуществляли электроперенос белков с геля на нитроцеллюлозные мембраны полусухим способом. Вестерн блоттинг проводили по стандартной методике [11]. В качестве первых антител использовали сыворотки лабораторных животных (мышей или кроликов), иммунизированных очищенными препаратами SPPV штамма «НИСХИ» (вакцинный) и «А» (эпизоотический). В качестве вторых антител использовали пероксидазные конъюгаты антивидовых антител. Пероксидазную активность выявляли с помощью преципитирующего в результате реакции субстрата – 3,3'-диаминобензидина.

### Результаты и их обсуждение

К настоящему времени известна полная нуклеотидная последовательность геномной ДНК вируса оспы овец [12]. Это обстоятельство позволяет проводить клонирование различных фрагментов вирусного генома возбудителя.

Учитывая экономическое значение вируса оспы овец, его потенциал для распространения в неэнзоотические регионы, а также необходимость создания против данного заболевания высокоэффективных и экономически выгодных вакцин, нами проведены исследования структуры генов вируса, кодирующих оболочечные белки, способные вызывать иммунный ответ в организме животных [13]. Отбор проводили в сравнительном анализе с имеющимися данными по антигенным белкам вирусовакцины штамма "Копенгаген".

Для проведения эксперимента нами была выбрана отрытая рамка считывания (ОРС) *EEV119* генома вируса оспы овец штамма "НИСХИ", кодирующая наружный оболочечный белок (поверхностный антиген). Аналогом данного гена является ОРС *A33R* вирусовакцины штамма "Копенгаген", для которого ранее была показана антигенная активность. На рисунке 1 представлена последовательность участка кДНК исследуемого гена.

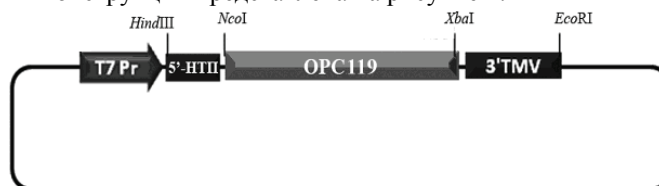


**Рисунок 1** - Нуклеотидная последовательность участка кДНК, соответствующая кодирующей области гена белка оболочки EEV119 вируса оспы овец, используемого для ПЦР-амплификации.

Стартовый (ATG) и стоп (TAA) кодоны выделены серым цветом; нуклеотиды, заменяемые для создания сайтов рестрикции на стадии ПЦР, выделены полужирным шрифтом (сверху или снизу этих нуклеотидов приведены буквы, на которые они замещаются в рекомбинантном гене); сайты рестриктаз (*NcoI* и *XbaI*) выделены курсивом и крупным шрифтом; подчеркнутые нуклеотиды соответствуют кодирующей области гена белка оболочки EEV119 SPPV

На следующем этапе работы проведена амплификация фрагмента кДНК, соответствующего кодирующей области гена белка оболочки EEV119 SPPV. Благодаря использованию праймеров с внесенными мутациями, амплифицированный фрагмент (длинной около 650 нуклеотидов) содержал сайты рестрикции *NcoI* (перед кодирующей областью) и *XbaI* (после кодирующей области) (рисунок 1).

Амплифицированный фрагмент ДНК клонировали в ДНК-конструкции, позволяющие с помощью РНК-полимеразы фага T7 синтезировать *in vitro* соответствующие им РНК. В первой ДНК-конструкции («Y-EEV119-TMV») в качестве 5'-нетранслируемой последовательности (НТП) использовалась лидерная последовательность геномной (г)РНК вируса Y картофеля (PVY), а во второй ДНК-конструкции («ARCx3-EEV119-TMV») – искусственно созданная энхансерная последовательность. Обе энхансерные последовательности были разработаны ранее [9]. В качестве 3'-НТП обеих конструкций использовалась 3'-НТП вируса табачной мозаики (TMV). Схема полученных ДНК-конструкций представлена на рисунке 2.

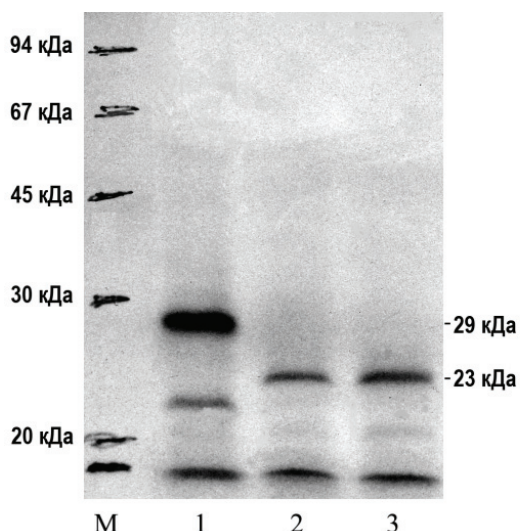


T7 Pr – промотор бактериофага T7; 5'-НТП – 5'-нетранслируемая последовательность («Y» или «ARCx3»); OPC119 – кодирующая область гена белка оболочки вируса оспы овец; 3'-TMV – 3'-нетранслируемая последовательность геномной РНК вируса табачной мозаики.

**Рисунок 2** - Схема созданных ДНК-конструкций, содержащих рекомбинантный ген белка внешней оболочки EEV119 вируса оспы овец.

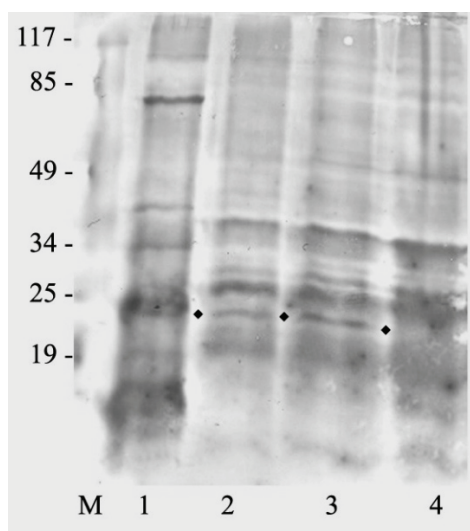
Корректность созданных ДНК-конструкций проверяли с помощью рестрикционного анализа. Для обеих конструкций были также определены нуклеотидные последовательности. ДНК-конструкции «Y-EEV119-TMV» и «ARCx3-EEV119-TMV» линеаризовали рестриктазой *EcoRI*, и использовали в качестве матрицы для *in vitro*-транскрипции. С использованием РНК-полимеразы бактериофага T7 проводили синтез некэпированных мРНК каждого испытываемого варианта. Транскрибированные мРНК дополнительно очищали и равные количества некэпированных мРНК транслировали в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. В качестве контрольной выступала РНК-конструкция «Y-GFP-TMV», не содержащая гена *EEV119*. Вместо него в конструкции находился ген, кодирующий зеленый флюоресцирующий белок GFP (от green fluorescent protein) размером около 29 кДа. Реакцию трансляции *in vitro* проводили в присутствии [<sup>35</sup>S]метионина. Электрофоретический анализ продуктов трансляции приведен на рисунке 3.

Как видно из рисунка 3, на дорожке 1 отсутствует продукт трансляции, соответствующий белку оболочки EEV119 SPPV, расчетная масса которого составляет около 23 кДа, но имеется хорошо выраженный полипептид с молекулярной массой около 29 кДа, соответствующий репортерному белку GFP. На дорожках 2 и 3 присутствуют продукты трансляции, соответствующие по размеру белку EEV119. Кроме того, из рисунка 3 видно, что 5'-НТП Y-вируса картофеля (Y) обеспечивает более высокий уровень синтеза белка EEV119 (дорожка 3), нежели искусственный трансляционный усилитель «ARCx3» (дорожка 2).



М - маркерные белки (перед радиоавтографией полосы маркера обводились радиоактивными  $^{14}\text{C}$ -чернилами); 1 - продукт трансляции репортерной мРНК «Y-GFP-TMV», которым является белок GFP с молекулярной массой 29 кДа; 2 - продукт трансляции мРНК, кодирующей EEV119, с 5'-НТП «ARCx3» (конструкция «(ARCx3)-EEV119-TMV»); 3 - продукт трансляции мРНК EEV119 с 5'-НТП гРНК вируса Y картофеля (конструкция «Y-EEV119-TMV»).

**Рисунок 3** - Авторадиография продуктов трансляции различных мРНК в бесклеточной системе зародышей пшеницы в присутствии [ $^{35}\text{S}$ ]метионина.



М - маркерные белки, кДа; 1 - 10 мкг белка из очищенного препарата вируса оспы овец; 2 - реакция трансляции мРНК «ARCx3-EEV119-TMV»; 3 - реакция трансляции мРНК «Y-EEV119-TMV»; 4 - реакция трансляции без мРНК; точками обозначено положение полипептида EEV119.

**Рисунок 4** - Иммуноблотинг белков, содержащихся в реакции трансляции *in vitro* в системе из зародышей пшеницы, с применением вторых антител, конъюгированных с пероксидазой.

Следует отметить, что вирусный белок EEV119 является гидрофобным. Это подтверждается компьютерным анализом, а также тем обстоятельством, что этот белок локализуется во внешней плазматической мембране клетки-хозяина. Известно, что синтез гидрофобных белков в бесклеточной системе значительно затруднен, из-за отсутствия или деградации мембранных структур, а также систем сортировки белков. Несмотря на это обстоятельство, как вирусный, так и искусственные трансляционные энхансеры обеспечивают достаточно высокий уровень синтеза белка EEV119 в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Также был проведен анализ белковых продуктов *in vitro*-трансляции мРНК «Y-EEV119-TMV» и «ARCx3-EEV119-TMV» с использованием метода иммуноблотинга (вестерн-блотинга).

В качестве первых антител использовались специфические к вирусу оспы овец сыворотки мышей. Результаты анализа приведены на рисунке 4.

Из-за того, что в качестве первых антител выступали не моноклональные, и даже не специфические поликлональные антитела к белку EEV119, на мембране проявлялись не только полосы, соответствующие исследуемому белку, но также и другие вирусные, а также некоторые мажорные клеточные белки. Однако, во второй и третьей дорожках (конструкции «ARCx3-EEV119-TMV» и «Y-EEV119-TMV»), присутствует полоса, соответствующая по электрофоретической подвижности белку EEV119 (около 23 кДа), которой не наблюдается на дорожке 4, соответствующей контрольной точке без добавления каких-либо мРНК.

Таким образом, в результате проведенных исследований определены антигенно активные белки вируса оспы овец. Осуществлено клонирование гена *EEV119* данного вируса в плазмидные вектора с получением ДНК-конструкций «Y-EEV119-TMV» и «ARCx3-EEV119-TMV». По матрицам этих ДНК-конструкций синтезированы соответствующие им РНК-конструкции, позволяющие продуцировать *in vitro* рекомбинантный белок EEV119. Было показано, что данный белок может корректно синтезироваться в растительных системах.

Следующим этапом работы может стать создание трансгенных растений, содержащих рекомбинантный ген белка внешней оболочки EEV119 вируса оспы овец, которые можно будет использовать в качестве съедобных вакцин для иммунизации овец.

#### Литература

- 1 Ma J., Drake P., Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants // *Nature Reviews (Genetics)*. -2003. -V. 4. -P. 794-805.
- 2 Ma J., Chikwamba R., Sparrow P., Fischer R., Mahoney R., Twyman R. Plant-derived pharmaceuticals - The road forward // *Trends in Plant Science*. -2005. -V. 10. -P. 580-585.

- 3 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.
- 4 Hansen E. Production of recombinant antigens in plants for animal and human immunization-a review // *Braz.J.Genet.* – 1997. - Vol.20, No.4. - P.1-15
- 5 Михайлов, В.В., Ручко, В.М., Махлай А.А. Трансгенные растения вакцинологии // *Вопросы вирусологии.* –2001. -№1. -С.4-8.
- 6 Рукавцова Е.Б., Золова О.Э., Бурьянова Н.Я., Борисова В.Н., Быков В.А., Бурьянов Я.И. Анализ трансгенных растений табака, содержащих ген поверхностного антигена вируса гепатита В // *Генетика.* – 2003. –Т.39, №1. -С. 51-56.
- 7 Филдс Б., Найн Д. Вирусология. - М.: Мир. -1989. -Т.1. -С. 26-28.
- 8 Gurevich V., Pokrovskaya I.D., Obukhova T.A. Preparative in vitro mRNA synthesis using SP6 and T7 RNA polymerases // *Anal.Biochem.* -1991. -V.195. -P. 207-213.
- 9 Akbergenov R., Zhanybekova S., Kryldakov R., Zhigailov A, Polimbetova N., Hohn T., Iskakov B. ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intercistronic region of mRNAs // *Nucleic Acids Research.* –2004. –V. 32. –P. 239-247.
- 10 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* -1970. -V. 227. -P. 680-685.
- 11 *Molecular cloning: A laboratory manual / E.F. Fritsch, T. Maniatis., Cold Spring Harbor Laboratory Press.* -2-d edition. -1989. -V. 3.
- 12 Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur J.-H., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L. The genomes of Sheeppox and Goatpox Viruses. // *Journal of Virology.* –2002. -V. 76, No. 12. -P. 6054 – 6061.
- 13 B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monathy, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology, 4th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.* –2001. -P. 2885–2921.

#### Тұжырым

Қой шешегі вирусының (SPPV, «НИСХИ» штамы) сыртқы қабықшасында орналасқан трансмембрандык белокты кодтайтын EEV119 кДНК-ген клондалды. «Y-EEV119-TMV» және «ARCx3-EEV119-TMV» рекомбинанттық конструкциялар жасалды. 5'-трансляцияланбайтын тізбек (5'-ТТ) ретінде картоп Y-вирусының (PVY) геномдық (г)РНК-ның 5'-ТТ «Y-EEV119-TMV» конструкциясында болды, ал «ARCx3-EEV119-TMV» конструкциясында бидай 18S рРНК-ның орталық аумағына (1113-1122 нуклеотидтер) комплементарлы 10-нуклеотидтік үш көшірме (ARCx3) болды. Сәйкес мРНК-дары in vitro жағдайда түзіліп, олардың тең жартысы бидай ұрығынан алынған жасушасыз жүйеде трансляцияланды. Екі конструкция да SPPV EEV119 белогының түзілуін айтарлықтай деңгейде қамтамасыз етсе де, PVY гРНК 5'-ТТ белок түзілуін күшейтуде ең жоғары қабілетпен ерекшеленді.

#### Summary

The cDNA gene, coding sheeppox virus (SPPV) (“NISCHI” strain) external envelope protein EEV122 has been cloned. Recombinant DNA-constructions «Y-EEV119-TMV» and «ARCx3-EEV119-TMV have been constructed. The first recombinant construction «Y-EEV119-TMV» in its 5'-untranslated region (5'-UTR) contained 5'-UTR of Potato Virus Y (PVY) genomic RNA, and the second one «ARCx3-EEV119-TMV» in its 5'-UTR contained three copy of 10-nucleotide sequence “ARC” (“ARCx3”), which was complementary to the central region of wheat 18S rRNA (nucleotides 1113-1122). Correspondent mRNAs have been synthesized in vitro, and these mRNAs were translated in wheat germ cell free system. It was shown, that both RNA-constructions provided a high level of SPPV EEV119 protein synthesis, though 5'-UTR of PVY gRNA provided higher translation level, than “ARCx3” sequence.

УДК 575.633.11

Чунетова Ж.Ж.

### РОЛЬ СОРТА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МУТАГЕНЕЗЕ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Проведен моносомный анализ реакции сорта Казахстанская 126 на действие ПАВ по фазам развития и по ряду количественных признаков. Выявлено различие между эффектом моносомного состояния растений и реакцией этого состояния на действие ПАВ у сорта Казахстанская 126. Под действием ПАВ установлено, что в хромосомах 7А и 1В локализованы гены, контролирующие раннее появление всходов, в хромосомах 2А, 6А – ускорение кущения, а в хромосомах 3А и 6В локализованы гены, определяющие замедление кущения. В процессе изучения мейоза молодых колосьев сорта Казахстанская 126 в опытном варианте наблюдалось нерасхождение хромосом (пикноз), такое нарушение обычно несвойственно моносомным линиям. Гены, контролирующие пикноз были локализованы в 1В, 2D и 3D хромосомах.

Работами ряда исследователей (Ларченко Е.А., Моргун В.В. и др.) убедительно показано, что с помощью мутагенов можно изменить такие признаки, как урожайность, высота стебля и плотность колоса, окраска и