

Ағарланған MS коректік ортасына отырғызылған қара сексеуіл экспланттарын 25<sup>0</sup>C температурада, 70% ылғалдылықта «Binder» климокамерасына өсіруге қойылды. 49-50 күн өткенде өсімдік дәнінен өскіндер өсіп шықты. Өсіп шыққан өскіндерді әрі қарай микроқалемшелеу арқылы көбейту үшін қолдандық.

Эксплант ретінде қара сексеуіл өсімдігінің дәнін, бір жылдық өркенін глицин, аскорбин қышқылы, мезо-инозит және сахарозамен байытылған, әмбебап MS коректік ортасына отырғызылды.

Экспланттарда жүретін өсіп – өну, каллус түзілу процестерін ынталандыру үшін, байытылған MS коректік ортасына концентрациялары және түрлі ара – қатынастағы әр түрлі фитогормондар әсерін анықтауға арналған 4 нұсқа сынақтан өтті. Нәтижелер кестеде көрсетілген.

Жұмысты қорыта келе, MS коректік ортасына 2,4-Д (0,25 мг/л), кинетин (0,03 мг/л) және ИУК (0,05 мг/л) пен кинетин (0,03 мг/л) қосылған орталарда сексеуіл экспланттарында каллус түзілу процесі қарқынды жүрді.

#### Әдебиеттер

- 1 Флора Казахстана.- Алматы, 1960. – Т. 3. - С. 304-305.
- 2 Жизнь растений. - М., 1980. - Т.5. – С.374-375.
- 3 ҚР Үкіметінің қаулысы № 488. – Астана: Ақорда, 2002.
- 4 ҚР Үкіметінің қаулысы № 441. – Астана: Ақорда, 2007.
- 5 Уәлиханова Г.Ж. Өсімдік биотехнологиясы. - А., 2009. – 336 б.
- 6 Рахимбаев И.Р., Валиханова Г.Ж. Клональное размножения растений // Вестник КазНУ. Серия биологическая. - 2002. - №1. - С.113-119.
- 7 Кириллов В.Ю., Казантапова Н.Б., Манабаева А.У., Дауленова М., Биотехнология в лесном хозяйстве: риски и выводы // Биотехнология. Теория и практика. - 2012. - №2. - С.3-8.
- 8 Мухамбетжанов С.К., Мурсалиева В.К., Вечерко Н.А., Нам С.В. Оптимизация протоколов питательных сред для микроклонального размножения роз // Вестник КазНУ. Серия биологическая. - 2011. - № 4. - С.45-48.
- 9 Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. - М., 1983. - 97 с.

УДК 577.217.5:577.218:578.821.2

Д.К. Бейсенов\*, Г.Э. Станбекова, А.В. Жигайлов, Б.К. Искаков  
Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, г.Алматы, Казахстан  
e-mail\*: [daniyar.b@mail.ru](mailto:daniyar.b@mail.ru)

#### Сравнение трансляционных энхансеров при синтезе *in vitro* белков оболочки A27L и L1R вируса оспы овец

Работа посвящена сравнению эффективности вирусных и искусственных усилителей трансляции (энхансеров) при синтезе белков оболочки A27L и L1R вируса оспы овец в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Для сравнения использовались 5'-нетранслируемые последовательности (НТП) геномных РНК Y вируса картофеля (PVY), вируса гравировки табака (TEV), геномной РНК-4 вируса мозаики люцерны (AMV), искусственная нуклеотидная последовательность 5xARC1, а также 3'-НТП геномной РНК вируса табачной мозаики (TMV). Оценка эффективности усиления трансляции проводилась флуориметрически с помощью репортерного белка β-глюкуронидазы (GUS) и с помощью иммуноблотинга белков A27L и L1R. Показано, что анализируемые 5'-НТП значительно повышают синтез белков в сравнении с произвольной нуклеотидной последовательностью (pl), не обладающей свойствами трансляционного энхансера.

**Ключевые слова:** энхансеры трансляции мРНК; бесклеточная система растений; синтез *in vitro* белков оболочки A27L и L1R; вирус оспы овец.

#### Қой шешегі вирусы қабықшасының A27L мен L1R белоктары *in vitro* түзілгенде трансляциялық энхансерлерін салыстыру

Жұмыс қабықшасының A27L мен L1R белоктары *in vitro* бидай ұрығының жүйесінде түзілгенде вирустардың және жасанды трансляциялық күшейткіштерінің (энхансерлерінің) тиімділігіне арналған. Салыстыру үшін картоп Y вирусының геномдық РНК (PVY), темекі қырнақшы вирусының (TEV), жоңышқа әшекей вирусының геномдық РНК-4 (AMV), 5xARC1 жасанды тізбегі, және темекі әшекей вирусының геномдық РНК (TMV) пайдаланылды. Трансляция күшейуінің тиімділігі репортерлік белок β-глюкуронидазаның (GUS) флуориметриясы және A27L мен L1R белоктары иммуноблотингі көмегімен

өткізді. Сыналған 5'-ТТ, белоктар түзілуін трансляциялық энхансер қасиеті жоқ кездейсоқ жасалған нуклеотид тізбегімен (pl) салыстырғанда, әжептәуір өсіреді.

**Кілт сөздер:** мРНҚ трансляцияның күшейткіштер, бидай ұрығының жүйесі, қабықшасының А27L мен L1R белоктарды *in vitro* синтездеу, қой шешегі вирусы.

D.K. Beisenov, G.E. Stanbekova, A.V. Zhigailov, B.K. Iskakov

### Comparison of translational enhancers in the course of *in vitro* synthesis of sheep pox viral coat proteins A27L and L1R

In this work the abilities of plant viral and artificial enhancers of mRNA translation to increase synthesis of sheep pox viral coat proteins A27L and L1R in wheat germ cell-free system is studied and compared. For such a comparison 5' untranslated regions (UTRs) of genomic (g)RNAs of potato virus Y (PVY), tobacco etch virus (TEV), gRNA-4 of alfalfa mosaic virus (AMV), artificial enhancer 5xARC1, as well as 3' UTR of a tobacco mosaic virus (TMV) gRNA were used. The assessment of translation enhancement was made by measurement of activity of newly synthesized reporter protein  $\beta$ -glucuronidase (GUS) that hydrolyzes the fluorogenic substrate, as well as with the help of immunoblotting of proteins A27L and L1R. It is established that examined 5'-UTRs can considerably raise synthesis of proteins in comparison with arbitrary leader sequence (pl), which does not possess translational enhancer property.

**Keywords:** enhancers of mRNA translation; plant cell-free system; synthesis *in vitro* of coat proteins A27L and L1R; sheep pox virus.

Известно, что РНК большинства растительных вирусов с высокой эффективностью транслируются в клетке-хозяине благодаря наличию нуклеотидных последовательностей в 5' и 3' НТП, выполняющих роль трансляционных энхансеров. Данные РНК могут превосходить по конкурентности клеточные мРНҚ [1, 2].

Для сравнения в данной работе были выбраны НТП четырех вирусов относящихся к разным систематическим группам (5'PVY, 5'AMV, 5'TEV, 3'TMV), а также искусственная нуклеотидная последовательность ARC1 в пяти повторностях (5'5xARC1).

Использование вирусных энхансеров возможный путь для повышения трансляции целевых белков. Примером таких целевых белков в данной работе являются белки оболочки А27L и L1R вируса оспы овец штамма, способные вызывать иммунный ответ у животных [3, 4].

Оспа овец высоко контагиозное заболевание мелких жвачных, способное вызывать эпизоотии и наносить экономический ущерб. В Республике Казахстан и других постсоветских странах используются аттенуированные штаммы для профилактики заболевания [3]. Рекомбинантные вакцины на основе белков оболочки являются альтернативой при создании более безопасной вакцины.

#### Материалы и методы

**Создание рекомбинантных ДНК.** Для создания ДНК-конструкций использовали любезно предоставленную Д.Р. Галли (Gallie D., Отдел Биохимии, Университет Калифорнии) плазмиду рТ7-рl-GUS-TMV, сконструированную на основе вектора рBlueScript KS II(+). Данная плазида содержит кДНК гена (*uidA*) репортерного белка  $\beta$ -глюкуронидазы [5], 5'НТП из 18 нуклеотидов (pl), не обладающая энхансерной способностью и 3'НТП вируса табачной мозаики (TMV).

Для клонирования кДНК генов, кодирующих белки А27L и L1R использовали коммерческую плазмиду рЕТ19b с поли-гистидиновой нуклеотидной последовательностью (HisTag) и компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH5.

**Рекомбинантные мРНҚ** получали транскрипцией *in vitro* с помощью РНК-полимеразы бактериофага Т7 согласно [6].

**Компьютерный анализ** последовательностей вирусных РНК, взятых из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) проводили с помощью программы *Vector NTI 8.0*.

**Трансляцию *in vitro*** проводили в бесклеточной системе из зародышей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Казахстанская 10», полученной согласно [7]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 20 мМ Трис-ОАс (рН 7,6), 90 мМ КОАс, 2.0 мМ Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1 мМ АТФ, 0.1 мМ GTP, 10 мМ креатинфосфат («Fluka»), 0.12 мг/мл креатинфосфокиназы («Sigma»), 0.1 мМ спермидин, по 0.1 мМ каждой из 20 аминокислот, 1 мкг мРНҚ и 11 мкл экстракта из зародышей пшеницы, приготовленного согласно [8]. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 26°C.

Эффективность трансляции рекомбинантных мРНҚ, кодирующих белок  $\beta$ -глюкуронидазу (GUS), определяли по активности GUS, которую измеряли флуориметрически [5] и выражали в условных

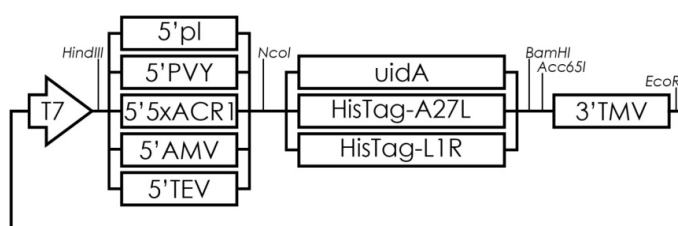
единицах. Эффективность трансляции мРНК, кодирующих белки A27L и L1R определяли с помощью иммуноблотинга с последующей денситометрией, которую также выражали в условных единицах.

**Общие методы.** Выделение ДНК, приготовление компетентных клеток *Escherichia coli* (*E.coli*), электрофорез ДНК и РНК в агарозном и полиакриламидном геле и трансформацию клеток *E.coli* проводили по стандартным методикам [9].

### Результаты и их обсуждение

**Клонирование кДНК генов A27L и L1R.** Амплифицированные с помощью полимеразной цепной реакции кДНК генов, кодирующие белки оболочки A27L и L1R были клонированы в вектор для бактериальной экспрессии белков рЕТ19b для слияния с последовательностью, кодирующей 10 гистицинов (HisTag).

**Создание конструкций для *in vitro* транскрипции.** 15 полученных ДНК конструкций для *in vitro* транскрипции изображены на рисунке.



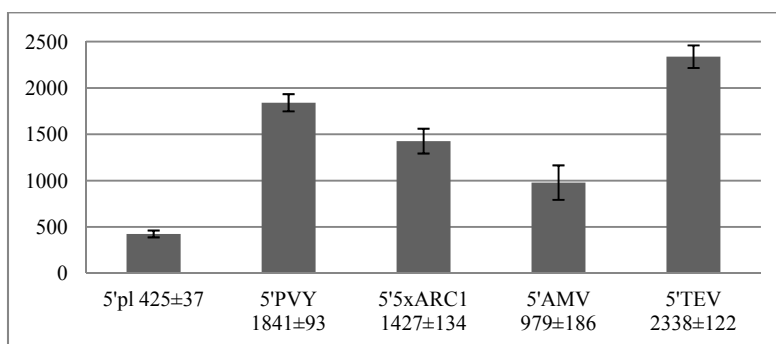
**Рисунок 1** – Плазмиды для *in vitro* транскрипции, содержащие промотор бактериофага T7, His-Tag, один из 5'НТП (pl, PVY, 5xARC1, AMV, TEV), один из кДНК генов белков GUS, A27L, L1R и 3'НТП (TMV)

Рекомбинантные ДНК рGUS (PVY, 5xARC1, AMV, TEV) были получены путем встраивания в исходную плазмиду рТ7-рl-GUS-TMV по сайтам рестрикции *HindIII* и *NcoI* фрагментов ДНК, содержащих 5'НТП, фланкированных теми же сайтами рестрикции.

Рекомбинантные ДНК рA27L (pl, PVY, 5xARC1, AMV, TEV) и рL1R (pl, PVY, 5xARC1, AMV, TEV) получали заменой кДНК гена *uidA* на нуклеотидную последовательность HisTag-A27L и HisTag-L1R из плазмид рЕТ19b по рестриционным сайтам *NcoI*-*BamHI*.

Правильность полученных конструкций проверили с помощью рестриционного анализа и секвенирования.

Размеры рестриционных фрагментов: 5'pl - 18пн, 5'PVY - 183пн, 5'5xARC1 - 140пн, 5'AMV - 34пн, 5'TEV - 143пн, кДНК гена *uidA* - 1873пн, *HisTag-A27L* - 528пн, *HisTag-L1R* - 645пн.

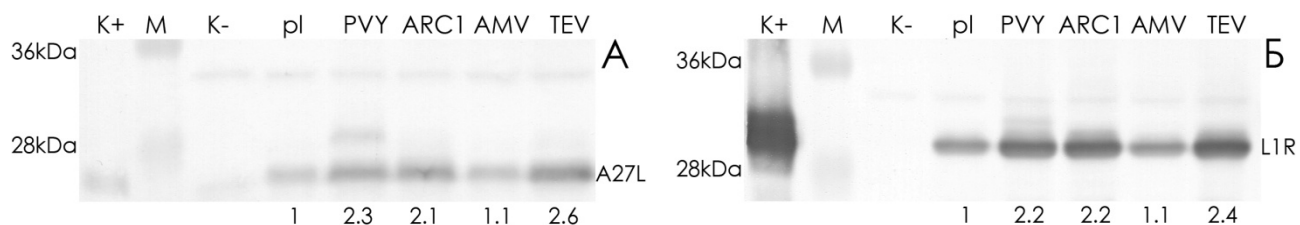


**Рисунок 2** – Уровень синтеза белка β-глюкуронидазы

***In vitro* транскрипция мРНК.** В качестве матрицы для *in vitro* транскрипции использовались описанные выше ДНК-конструкции, линейризованные по сайту *EcoRI*. Для сравнения эффективности трансляции мРНК без 3'TMV, две ДНК-конструкции рPVYGUS и рTEVGUS были линейризованы по рестриционному сайту *Acc65I* и также транскрибированы.

Полученные РНК транскрипты, названные mGUS (pI, PVY, ARC1x5, AMV, TEV), mA27L (pI, PVY, ARC1x5, AMV, TEV), mL1R (pI, PVY, ARC1x5, AMV, TEV) использовались для трансляции белков GUS, HisTag-A27L и HisTag-L1R в бесклеточной системе из зародышей пшеницы.

*Результаты in vitro трансляции.* По количеству активного белка  $\beta$ -глюкуронидазы видно, что анализируемые 5'НТП и 3'TMV значительно повышают синтез белков в сравнении с контрольной 5'pI: 5'PVY в 4.33 раза 5'5xARC1 в 3.36 раза, 5'AMV в 2.3 раза, 5'TEV в 5,5 раза (рисунок 2).



M – белковый маркер (размеры указаны), K+ - белки синтезированные в клетках *E.coli*, K- - система из зародышей пшеницы без трансляции рекомбинантных белков; цифрами снизу обозначены условные единицы эффективности трансляции

**Рисунок 3** – Иммуноблотинг белков A27L с антителами AntiHisTag (A) и иммуноблотинг белков L1R с антителами AntiHisTag (Б)

В отсутствие 3'TMV уровень трансляции снижался приблизительно на 15%.

Результат трансляции рекомбинантных белков оболочки вируса оспы овец оценивался с помощью иммуноблотинга со специфичными антителами к белкам A27L и L1R, а также с антителами к HisTag (рисунок 3) и последующей денситометрией блотов, выраженной в условных единицах.

Таким образом, анализируемые НТП показали значительное усиление трансляции рекомбинантных мРНК.

#### Литература

- 1 Bailey-Serres J. Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants // Trends in Plant Science. – 1999. – V.4. - No.4. – P. 142-148.
- 2 Hellen Ch.U.T., Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules // Genes Dev. – 2001. – V.15. – P.1593-1612.
- 3 Орлова Е.С. Совершенствование методов диагностики оспы овец и оспы коз. – Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. –Владимир, 2007. – 6 с.
- 4 Mangana-Vougiouka, O. Sheep poxvirus identification from clinical specimens by PCR, cell culture, immunofluorescence and agar gel immunoprecipitation assay // Molecular and Cellular Probes. – 2000. – V.14. -No5. – P.305-310.
- 5 Gallie D.R., Feder J.N., Schimke R.T., Walbot V. Post-transcriptional regulation in higher eukaryotes: The role of the reporter gene in controlling expression // Mol.Gen.Genet. – 1991. –V.228. – P. 258-264.
- 6 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.
- 7 Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A.V., Polimbetova N.S., Hohn T., Isakov B.K. 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. – No.1. – P. 239-247.
- 8 Johnston F.B., Stern H. Mass isolation of viable wheat embryo // Nature. – 1957. – No.179. – P. 160-161.
- 9 Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning (a laboratory manual). -New York: Cold Spring Harbor Lab.Press, 1989, V.3. – 545 p.