

УДК 222.111

Д.А. Копытина\*, Н.Н. Галиакпаров

Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан,

\*e-mail: d.kopytina@gmail.com

### Изучение способности вируса А винограда инфицировать *Nicotiana Benthamiana* при агробактериальной инфильтрации

В данной работе был создан бинарный вектор, несущий полный геном инфекционного клона вируса А винограда с фланкирующими его регуляторными последовательностями (35S- промотер, 35S- терминатор). Данным вектором была произведена трансформация агробактерий с целью доставки данного вирусного генома в растения путем агроинфильтрации. Агроинфильтрацию проводили бактериями различной оптической плотностью, с целью выявить оптимальную плотность для табака. Через 7-10 дней после агроинфильтрации были замечены первые признаки инфекции у растений, что подтверждает сохранение инфекционной способности вируса.

**Ключевые слова:** Геном вируса А винограда, вирусный вектор, бинарный вектор, агроинфильтрация, гетерологичные гены.

Д.А Копытина, Н.Н. Галиакпаров

### *Nicotiana Benthamiana*-ға агробактериалдық инфильтрация жағдайында жұқтырылған жүзімнің А вирусының қабілеттілігін зерттеу

Бұл жұмыста жүзімнің А вирусының инфекциялық клонының екі қапталдан қорғайтын реттегіш тізбектері бар (35S- промотер, 35S- терминатор) толық геномды бинарлы векторы құрылды. Өсімдікке вирусты жеткізу мақсатымен, осы векторды агробактериалдық тасымалдау арқылы, агроинфильтрация жолымен жүргізілді. Агроинфильтрацияны темекінің оптималды тығыздығын табу үшін, оптикалық тығыздығы әр түрлі бактериялармен жүргіздік. Агроинфильтрация кезінде, 7-10 күннен кейін өсімдіктерде инфекцияның алғашқы белгілері пайда бола бастады. Бұл вирустың инфекциялық қабілетінің сақталатынын дәлелдейді.

**Түйін сөздер:** Жүзімнің А вирусының геномы, вирустық векторлар, бинарлы векторлар, агроинфильтрация, гетерологиялық гендер.

D.A Kopytina, N.N Galiakparov

### Investigation of ability of the grapevine virus A to infect *Nicotiana Benthamiana* by using *Agrobacterium* infiltration

In this work was created binary vector carrying the complete genome of an infectious clone of the virus A grape with flanking regulatory sequences (35S- promoter , 35S- terminator ). *Agrobacterium* was transformed by this vector for delivery viral genome into plants by using agroinfiltration . Agroinfiltration was carried by bacteria of different optical density, in order to identify the optimum density for tobacco. Early signs of infection were noticed at 7-10 days after agroinfiltration in plants, which confirms the continuation of infectivity of the virus.

**Keywords:** Grapevine virus A genome, a viral vector, a binary vector, agroinfiltration, heterologous genes

Использование растений как биофабрик для производства целевых продуктов является уже не новшеством, где меняются только подходы внесения гетерологичного гена в растение. В настоящий момент широко используются методики создания трансгенных растений для экспрессии целевых белков, а также транзиентная экс-

прессия, осуществляемая благодаря векторам на основе вирусов. Создание векторов на основе вирусов дает возможность эффективно получать целевые продукты при минимальной затрате [1]. В настоящий момент существует две стратегии создания вирусных векторов: первая- использование полного генома вируса с гетерологичным

геном, вторая – интегрированная система экспрессии, где генетическую модификацию претерпевают как геном вирусов так и геном растений в котором будет амплифицироваться вирус [2]. Вирусные вектора используются не только в коммерческих целях, но также для изучения механизмов репликации, передвижения, инкапсидации вируса, полученные знания в дальнейшем дают возможность усовершенствовать системы экспрессии гетерологичных генов с максимальным выходом целевого продукта. Клонирование полного генома вируса А винограда в бинарный вектор с сохранением его инфекционной способности даст возможность путем генной инженерии создать вирусный вектор, несущий целевой ген для экспрессии гетерологичных продуктов для медицины, сельского хозяйства, биотехнологических производств, научных целей и так далее.

#### Материалы и методы

**Штаммы и вектора.** В работе были использованы следующие штаммы бактерий: *Escherichia coli* DH5, *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА 105. Полный геном вируса А винограда был получен из конструкции рCASS несущей полный геном инфекционного клона данного вируса. Для внесения вируса в растение путем агроинфильтрации был использован бинарный вектор рCambia 2300.

**Среды.** Была использована среда Луриа-Бертани (ЛБ) производства Sigma-Aldrich, концентрация антибиотиков составляла для ампициллина – 100 ug/ml, канамицина – 50 ug/ml, рифампицина- 50 ug/ml.

**Реактивы.** Все реактивы, использованные в работе, были производства Sigma-Aldrich, Thermo Scientific с категорией чистоты «Для молекулярной биологии».

**Создание конструкции.** Конструкция использованная для агроинфильтрации табака состояла из бинарного вектора рCambia 2300 и полного генома вируса А винограда с фланкирующими его регуляторными последовательностями (35S- промотер, 35S- терминатор). Геном с фланкирующими его регуляторными последовательностями был вырезан из конструкции рCASS [3] по сайтам PvuII. Клонирование в бинарный вектор производили по сайтам Ecl136II путем лигирования Т4 ДНК лигазой по тупым концам по следующей методике:

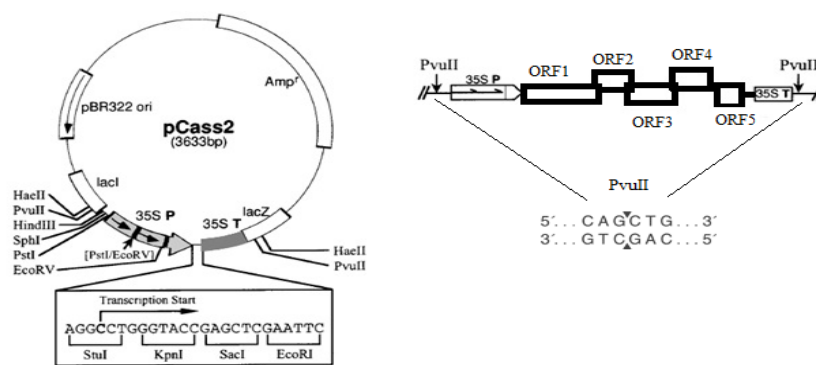
100 ng рCambia 2300 (Ecl136II) добавляли к 100 ng вставки (вырезанный геном вируса А винограда по сайтам PvuII ), далее добавлялся 10х буфер Т4 ДНК лигазный и Т4 ДНК лигаза в размере 5 ед. Смесь оставлялась на ночь на +4С. Впоследствии, данной смесью были трансформированы химически (RbCl<sub>2</sub>) компетентные клетки *Escherichia coli* DH5.

**Выделение конструкции из *Escherichia coli* DH5.** 5 белых колоний, рCambia 2300 ввиду наличия lacZa в сайте множественного клонирования подвергается отбору по принципу белых и голубых колоний, были независимо инокулировали в 5 пробирок Falcon (50ml) со средой ЛБ содержащей канамицин, растили бактерии в течение ночи, после чего выделяли плазмидную ДНК.

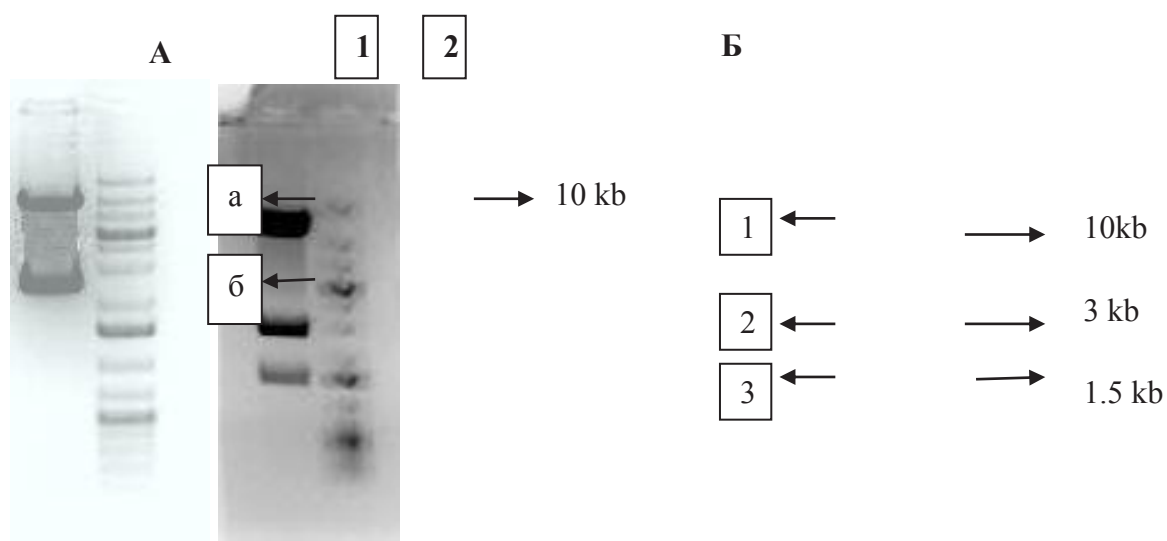
Выделение проводили с помощью Gene Jet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). Анализ проводили методами ПЦР (специфичными праймерами для 3 и 4 ОРС вируса А винограда) и рестрикции на наличие генома вируса А винограда в бинарном векторе.

**Трансформация агробактерий.** Трансформацию компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА 105 проводилась по модифицированному методу оттаивания – замораживания [4]. 1 ug конструкции (бинарный вектор с геномом вируса А винограда) добавляли к 100 ul химически компетентных клеток (CaCl<sub>2</sub>) замороженных на -80С, инкубировали во льду 5 минут, далее замораживали в 96 % спирте, предварительно выдержанном на -80С в течении 30 минут, в течении 5 минут, в последующем этапе смесь оставляли при комнатной температуре в течении 7 минут. После оттаивания добавляли 1 мл ЛБ среды и инкубировали в термошейкере в течении 3-4 часов(28С) при скорости вращения 200 грм. После 3-4 часов инкубации клетки центрифугировали при 5000 об/мин в течении 5 минут. Осадок клеток растирали на чашках содержащих агаризованную ЛБ среду с канамицином(50 ug/ml) и рифампицином (50 ug/ml) и оставляли на 2 суток при 28 С.

**Агроинфильтрация табака.** Агроинфильтрацию проводили по методике, описанной в статье, приведенной в источниках литературы [5]. 2 независимыми отобранными клонами трансформировали 10 растений, по 5 на каждый клон с разной оптической плотностью для каждого клона в отдельности: OD- 0.4; 0.6; 1



**Рисунок 1-** Схематическое изображение вырезания полного генома вируса А винограда с 35S промотером и 35 S терминатором из вектора pCass.



А: 1- образец, 2- маркер; а- геном вируса А винограда с 35S промотером и 35 S терминатором; б- вектор pCass  
 Б: 1- полоса соответствующая вектору pCambia 2300 с 35 S терминатором и геномом ВАВ до сайта рестрикции в положении 3425п.н.; 2- полоса соответствует части генома ВАВ до сайта рестрикции в положении 1978 п.н с 35S промотером; 3- полоса соответствует части генома между сайтами рестрикции в положениях 1978 п.н и 3425 п.н.

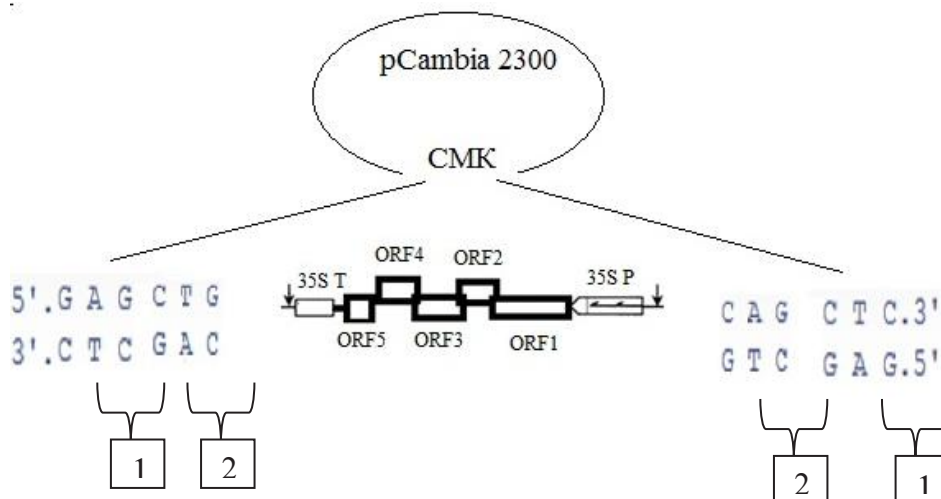
**Рисунок 2-** Изображение гель- электрофореза: А- после рестрикции вектора pCass, несущего полный геном вируса А винограда по сайтам PvuII; Б- анализ конструкции на наличие генома вируса А винограда методом рестрикции ферментом HindIII

**Результаты и обсуждение**

В виду проблемной экспрессии вируса А винограда в табаке в векторе pCASS из-за затруднительной доставки в растение и необходимости большой концентрации, имеется возможность создания вектора с элиминацией данных проблем. Бинарный вектор с полным геномом вируса А винограда с большей эффективностью попадает в растение благодаря агробактериям.

Изучение экспрессии полного генома вируса в растениях при агроинfiltrации дает возможность на основе данного вируса создать уже вирусный вектор для экспрессии гетерологичных генов.

**Конструирование вектора.** Вырезание полного генома вируса А винограда из вектора pCass по сайтам PvuII показано на изображении 1. Ввиду того, что после рестрикции



1-изображение сайта *Ecl136II* после клонирования; 2- изображение сайта *PvuII* после клонирования

**Рисунок 3-** Схематическое изображение созданной конструкции на основе бинарного вектора



А- изображение табака на 7 дней после заражения; Б- Изображение табака на 11 день после заражения

**Рисунок 4** – Изображения зараженного табака

*PvuII* рестриктазой образуются тупые концы и в случае рестрикции *pCambia 2300* рестриктазой *Ecl136II* образуются тупые концы, лигирование осуществлялось по тупым концам. Размер клонируемого фрагмента составлял 8600 п.н. Анализ на наличие клонируемого генома, созданной конструкции в бинарном векторе проводился методами ПЦР анализа с помощью специфических праймеров: прямой праймер на ORF3, обратный праймер на ORF 5. Анализ методом рестрикции проводили с помощью рестрикционного фермента *HindIII*, 2 сайта

(в положении 1978 п.н, 3425 п.н) для данного фермента находится в последовательности генома вируса А винограда и 1 сайт в сайте множественного клонирования (CMK) векторе *pCambia 2300* **смотреть рисунок 2**. Рестрикционный анализ показал, что клонируемый фрагмент был перевернут, т.е последовательность в векторе была следующей начиная с 5' конца последовательности сайта *Ecl136II* *pCambia 2300* : 35S терминатор, геном ВАВ, 35S промотер, что абсолютно не влияет на экспрессии вируса.

**Анализ распространения инфекции в табаке.** Первые признаки инфекции были обнаружены на 7-11 день после агроинфильтрации при чем заражение растений было практически одновременным не смотря на разные оптические плотности бактерий, в виду чего в дальнейшем будет использована средняя плотность 0,6, которая используется в мировой практике при агроинфильтрации. Проявления полных признаков инфекции были отмечены на 11-20 дни.

В результате работы было выявлено сохранение инфекционной активности вируса А винограда при клонировании его генома в бинарный вектор. Кроме того, агроинфильтрация облегчает процесс доставки вируса в растение по сравнению с механической инокуляцией вирусного вектора в плазмиде pCass. Полученная конструкция будет использована для создания вирусного вектора путем модификации его генома инсерцией гетерологичных генов для получения целевых белков.

#### Литература

- 1 Yuri Gleba, Victor Klimyuk, Sylvestre Marillonnet. Viral vectors for the expression of proteins in plants // Current Opinion in Plant Biology.- 2007.- Vol.18.-P. 134-141.
- 2 Yuri Gleba, Sylvestre Marillonnet,Victor Klimyuk. Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies // Current Opinion in Plant Biology.- 2004.- Vol.7.-P. 182-188.
- 3 Sabrina Haviv , Nurbol Galiakparov , Dariusz E. Goszczynskib,Ozgur Batumana, Henryk Czosnek, Munir Mawassi. Engineering the genome of *Grapevine virus A* into a vector for expression of proteins in herbaceous plants // Journal of Virological Methods.-2006,- Vol. 132/- P. 227-231.
- 4 H.Inoue, H.Nojima, H.Okayama. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids // Gene.-1990.- 96.- P.23-8.
- 5 Imogen A Sparkes, John Runions, Anne Kearns. Chris Hawes. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stablytransformed plants // Nature protocols.-2006.-Vol.1, № 4.- P. 2021- 2025.