СОЗДАНИЕ ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ЦЕЛЕВЫХ ПЕПТИДОВ В ТРАНСЛЯЦИОННОМ СЛИЯНИИ С БЕЛКОМ ТАУМАТИН II В РАСТЕНИИ

Пушин А.С., Фирсов А.П., Долгов С.В.

Филиал Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки Института Биоорганической Химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук, г.Пущино Московская область

В настоящее время трансгенные растения используются как биофабрики для наработки важных белков и пептидов. Однако существуют трудности с наработкой коротких пептидов в растениях. Часто для усиления экспрессии таких пептидов используют белки-носители. В данной работе создан вектор для трансформации растений, содержащий ген растительного сладкого белка тауматина II, с целью экспрессии целевых пептидов в трансляционном слияния с тауматином II в растениях. Для этого был сконструирован химерный ген tse, включающий N-концевую сигнальную последовательностью хитиназы из Arabidopsis thaliana и последовательность, кодирующей зрелый тауматин II из Thaumatococcus danielii. Нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый тауматин II, амплифицировали при помощи ПЦР с использованием праймеров UETh (CCG GAA TTC GCC ACC TTC GAG ATC GT) и LSTh (GAT GAG CTC TTA GGC AGT AGG GCA GAA AGT), содержащие сайты эндонуклеаз рестрикции EcoRI и SacI. В качестве матрицы использовали плазмиду pUR528, любезно предоставленную доктором A.M. Ledeboer (Unilever Research Labs, Нидерланды), с клонированной в ней последовательностью кДНК гена тауматина II (Edens, 1982). Полученный ПЦР - продукт обрабатывали рестриктазами EcoRI и SacI и клонировали по этим же сайтам в вектор pBINmGFP5ER, любезно предоставленный доктором Jim Haseloff (Haseloff 1997) вместо гена mGFP5ER, и секвенировали. В итоговом сконструированном векторе pBINTSE уникальный сайт EcoRI находится в химерном гене tse на границе нуклеотидной последовательности N-концевого сигнального пептида хитиназы A. thaliana и зрелого тауматина II (по этому сайту можно клонировать нуклеотидные последовательности, кодирующие целевые пептиды). Сконструированный вектор pBINTSE использовали для агробактериальной трансформации растений табака. В результате трансформации получено 10 трансгенных линий табака, в которых интеграция гена tse была подтверждена ПЦР анализом. Эти линии табака использовали для анализа экспрессии гена химерного тауматина, который проводили с помощью Вестерн-блот-анализа. Определяли тауматин в общем растворимом белке, вытяжке из апопласта и в остаточной ткани как описано (Пушин и др., 2008). Анализ экспрессии показал, что в растениях, трансформированных вектором pBINTSE, тауматин синтезируется и накапливается в апопластном пространстве. N-концевой сигнальный пептид хитиназы, по-видимому, также эффективно направляет тауматин в эндоплазматический ретикулум клетки и далее в апопласт, как и нативный N- концевой сигнал тауматина (Пушин, 2011). По данным ИФА уровень накопления тауматина доходил до 0,5% от общего растворимого белка. Тауматин в трансгенных растениях детектировался на уровне около 22 кДа и мигрировал на одном уровне со зрелым тауматином (22,4 кДа). Это указывает на отщепление N-концевого сигнального пептида и, следовательно, на корректный процессинг предшественника тауматина в растениях табака. Листья трансгенных растений табака характеризовались сладким вкусом, что также, косвенно подтверждает корректный фолдинг тауматина в трансгенных растениях. Рассчитанный в программе SignalP4.1 сайт протеолиза, находящийся между N-концевой сигнальной последовательностью из хитиназы и зрелым тауматином II показал, что добавленные две а.к. остатка Glu и Phe (результат введения сайта EcoRI), остаются связанными с молекулой зрелого тауматина II. Таким образом, клонированные по сайту EcoRI нуклеотидные последовательности, кодирующие целевые пептиды, будут трансляционно слиты с молекулой тауматина II и тем самым могут накапливаться при экспрессии в растении.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Минобрнауки Российской Федерации № 14.518.11.7037.

Список литературы:

Edens L., et al. Cloning of cDNA encoding the sweet-testing plant protein thaumatin and its expression in Escherichia coli // Gene. – 1982. – V.18. – P.1-12.

Haseloff J., et al. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1997. – V.94. – P.2122–2127.

Пушин А.С. и др. Аккумуляция рекомбинантного суперсладкого белка тауматина II в апопласте трансгенных растений табака // Биотехнология. 2008. - №6.- С. 31-40.

Пушин А.С. и др. Изучение экспрессии гена сладкого белка тауматина II из Thaumatococcus daniellii в трансгенных растениях табака // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. ОВЧИННИКОВА. Том: 7 Номер: 4. Стр.: 51-52.