ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ СИНТЕТИЧЕСКОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕПТИДА M2e ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ В СЛИЯНИИ С ГЕНОМ БЕТА-ГЛЮКУРОНИЗИДАЗЫ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

Тарасенко И.В., 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

Целью данного исследования было клонирование и анализ экспрессии в растениях табака пептида M2e белка M2 вируса гриппа птиц H5N1 для последующей разработки съедобной вакцины ветеринарного назначения. Для экспрессии в трансгенных растениях выбран аминотерминальный фрагмент белка M2 вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/5/05 H5N1 (GenBank DQ449633.1) длиной 43 аминокислотных остатка (M1-43). Обратная трансляция выбранной для экспрессии белковой последовательности M2 в нуклеотидную проведена с учетом рассчитанных ранее частот использования кодонов в растениях ряски малой (http://slam.bs.jhmi.edu/gd/). Оптимизация кодонного состава синтезируемого фрагмента выполнена с помощью программы DNA2.0 Gene Designer, расчет частоты встречаемости кодонов выполнялся с помощью web-инструмента GCUA SECOVERALL (http://gcua.schoedl.de/seqoverall.html). С учетом введения в экспрессируемую последовательность сайтов рестрикции и инициирующего метионина, была получена окончательная нуклеотидная последовательность 5'-фрагмента гена M2 вируса гриппа птиц: ctgatctgca gatgTCCCTC CTCACTGAAG TCGAAACTCC TACTAGAaat gaatgggagt gcagatgctc tgattccagc gacccttgg tggtggcggc gtccatcatc ggcatcctgc atctcatcct ctggatcctc, где выделен наиболее вероятный антигенный эпитоп. Синтез нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид M1-43, выполнен методом лигирования перекрывающихся олигонуклеотидов (Тарасенко и др.. 2012). Одной из задач нашей работы стало исследование возможности экспрессии синтетического фрагмента гена M2 в растительных клетках. В качестве вектора для трансформации растений выбрана плазмида pBI121. В этом векторе синтетический фрагмент M-143 был клонирован вместо гена бета-глюкоронизидазы (GUS) под контроль промотора CaMV35S. Итоговую плазмиду, обозначенную как pBI121M2, переносили в агробактериальный штамм CBE21 и использовали трансформации растений табака. Далее методом ПЦР было показано наличие вставки фрагмента M1-43 в ДНК 15 полученных трансформантов. В дальнейшем из листьев отобранных трансгенных линий табака была выделена тотальная РНК, необходимая для ОТ-ПЦР анализа. В результате было показано наличие фрагментов ожидаемого размера в трех линиях трансгенного табака, что указывало на успешную транскрипцию синтетического гена M-143 в растениях. Однако, проведенный в последующем вестерн-блот-анализ препаратов тотального белка трансгенных растений табака с использованием антител к белку M2 вируса гриппа, не выявил наличия целевого продукта, что согласовывалось с рядом литературных данных (Twyman et al., 2003). Полученные результаты позволили нам сделать выводы о принципиальной возможности экспрессии синтетического гена M1-43 в растениях, и необходимости использования трансляционного слияния короткого пептида M1-43 с каким-либо белком-носителем. Следующим этапом нашей работы стало клонирование синтетического фрагмента M1-43 в трансляционном слиянии с бета–глюкуронизидазой (GUS). 5'-фрагмент гена M2 клонировали в векторе pBI121 в трансляционном слиянии с 5'- концом гена GUS. В результате была получена плазмида, обозначенная как pBIM143. Плазмида pBIM143 была перенесена в агробактериальный штамм CBE21 и использована для трансформации растений табака. В результате было получено 12 линий трансгенных растений, содержащих слитую последовательность генов M1-43-GUS. Эти растения выращивали в условиях теплицы и использовали для анализа. Высечки из листовых пластинок растений серии M1-43 использовали для гистохимического окрашивания на наличие активности GUS. Степень окрашивания отдельных трансгенных растений варьировала от интенсивной до слабой. Иммунохимический анализ препаратов тотального белка, выделенного из листьев трансгенных растений, с использованием антител против GUS и пептида M2e, подтвердил экспрессию слитого протеина в 10 линиях. Таким образом, результаты проведённых исследований подтвердили возможность экспрессии в трансгенных растениях 5´-фрагмента гена M2 вируса гриппа птиц в трансляционном слиянии с GUS.

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

Список литературы:

Тарасенко И.В. Экспрессия нуклеотидной последовательности пептида M2e вируса гриппа птиц в трансгенных растениях табака. // Биотехнология. – 2012. - № 4. С. 18-25

Twyman R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. // Trends in Biotechnology. 2003. V.21. №.12. P.570-578.