

## Секция 5. Клеточная и генетическая инженерия

---

УДК 57.084.1, 577.29, 577.2.08, 615.22

### РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ И ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЛИНИЙ ВОЛЬФИИ БЕСКОРНЕВОЙ (*WOLFFIA ARRHIZA*) СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ БЕЛКОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

П.А. Хватков<sup>1,3</sup>, А.Н. Шведова<sup>1</sup>, М.А. Чернобровкина<sup>1</sup>, А.С. Пушин<sup>1,2</sup>, А.П. Фирсов<sup>1,2</sup>,  
Л.А. Шалойко<sup>2</sup>, С.В. Долгов<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

<sup>2</sup> Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пуцдино, Россия

<sup>3</sup> Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Россия

В течение последних 30 лет было разработано много технологий для наработки рекомбинантных белков. Их получают из клеток бактерий, дрожжей, млекопитающих и насекомых. Однако такие системы имеют ряд существенных недостатков. В клетках прокариот не происходят посттрансляционная модификация и правильная укладка полипептидных цепей многих эукариотических белков. Клетки животных лишены подобных недостатков, но их использование в качестве биопродукторов ограничено высокой себестоимостью получаемых рекомбинантных белков. В клетках высших растений происходят гликозилирование и фолдинг белков, сходные с таковыми у млекопитающих. В отличие от животных, растительные клетки не содержат в своём составе патогенных для человека вирусов и микроорганизмов и могут служить безопасным источником рекомбинантных белков медицинского назначения. При выборе растения-продуцента чужеродных белков важно учитывать исходное содержание белка в растении. Растения семейства Рясковые удваивают биомассу популяции за 1–6 суток, подобно водорослям и грибам, а содержание белка достигает 45 % от сухой массы.

До 2001 г. работы по биотехнологии ряски проводились преимущественно с видом *Lemna gibba*. С начала 21 века были получены первые трансгенные растения рода *Lemna*, а с конца первого десятилетия 21 века и первые трансгенные растения рода *Spirodela*, экспрессирующие рекомбинантные белки фармацевтического и ветеринарного назначения. Однако, несмотря на возросший интерес к растениям семейства *Lemnaceae* и активные исследования в этом направлении, в настоящий момент нет ни одного сообщения о стабильной трансформации растений рода *Wolffia*. *Wolffia arrhiza* – наиболее эволюционно продвинутое вторично примитивно организованное растение из семейства *Lemnaceae*. *W. arrhiza* отличается от других рясок отсутствием корневой системы, что позволяет культивировать ее в биореакторах глубинным способом, что в свою очередь способно существенно увеличить рентабельность производства рекомбинантных белков.

Таким образом, целью наших исследований стала разработка протокола стабильной генетической трансформации растений *Wolffia arrhiza* для последующего использования в качестве экспрессионной платформы для наработки рекомбинантных терапевтических белков.

В ходе исследований использовали асептическую популяцию целых растений вольфии. В качестве эксплантов для трансформации мы использовали кластерные структуры вольфии прошедшие 4-х месячную прекультивацию на среде Шенка-Хильдебрандта (SH), содержащей 1 % маннитола, 1 % сорбитола, 2 % глюкозы в качестве источников углерода и дополненной 5,0 мг/л 2,4–D совместно с 0,5 мг/л ВА. В экспериментах по агробактериальной трансформации мы использовали 3 бактериальных штамма: AGL0 содержащий конструкцию pCamGFP (Рис. 1А), AGL0 содержащий конструкцию pVec035 (1В), CBE21 содержащий конструкцию pBINmGFP5ER (Рис. 1Б) и ЕНА105 содержащий конструкцию pVec035.

Трансформацию проводили методом кокультивации эксплантов с суспензией агробактерии ( $OD_{600} = 0,4–0,6$ ). Для инокуляции 200 г. растительного материала помещали в колбу с 500 мл инокулюма и выдерживали ее в течение 30 мин на орбитальном шейкере (100 об/мин). Подсушенные в потоке воздуха ламинар-бокса экспланты переносили на бумажные фильтры, помещённые на поверхность среды SH в чашках Петри, и кокультивировали на свету в течение 72 ч. Далее экспланты отмывали жидкой безорганической средой SH с добавлением 300 мг/л тиментина (Tm) и переносили на среды для культивирования эксплантов и элиминации агробактерии (Tm 100 мг/л). Длительность каждого пассажа составляла 2 недели.

В ходе проведения 34 экспериментов по агробактериальной трансформации было установлено, что добавление в среду канамицина способно вызывать витрификацию трансгенной ткани, что в свою очередь приводит к потере пролиферативной активности и снижению эффективности трансформации вольфии. Результативная селекция трансгенных линий происходила в присутствии в среде гигромицина (Hug) в концентрации 5 мг/л.

В результате проведенных исследований мы пришли к выводу, что для успешной трансформации необходимо на протяжении первых 2 недель культивирования протрансформированных эксплантов присутствие в среде 2,4-D совместно с ВА. При более продолжительной культивации эксплантов на средах с добавлением 2,4-D совместно с ВА стабильной трансформации вольфии не наблюдалось. В предыдущих исследованиях нами отмечалось, что возможно осуществить преимущественную пролиферацию каллусных клеток путем добавления в среду для культивирования пиклорама (PCL). Однако, основываясь на данных результативных экспериментов, можно отметить, что стабильная трансформация вольфии происходила при использовании на первом пассаже схожих по своему составу сред: 1-SH среда + 2,4-D 2,5 мг/л + ВА 1,0 мг/л + Hug 5,0 мг/л + Tm 100,0 мг/л и 2-SH среда + 2,4-D 1,5 мг/л + ВА 1,5 мг/л + Hug 5,0 мг/л + Tm 100,0 мг/л.

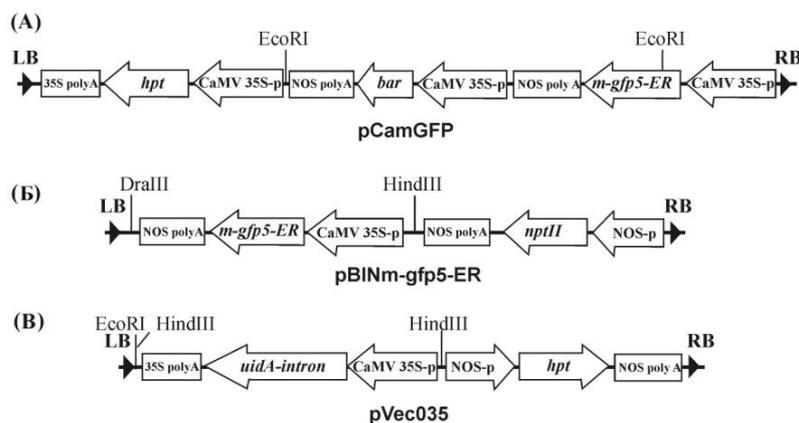


Рис. 1. Структура Т-ДНК конструкций, где: А – pCamGFP, Б – pBINmGFP5ER и В – pVec035.

В результате были получены 4 трансгенные популяции вольфии, которым были присвоены следующие наименования: Sb5/2, Nb5/2, Nb7/2 и Co1/3. Согласно Саузерн-блот анализу все полученные линии (Sb5/2, Nb5/2, Nb7/2 и Co1/3) содержали геномную вставку гетерологичной ДНК: линия Sb 5/2 содержала ген *hpt* (интеграция гена *gfp* отсутствовала), линии Nb5/2, Nb7/2 и Co1/3 содержали гены *uidA* и *hpt* (Рис. 2). Все полученные линии были проанализированы на наличие экспрессии репортерных белков. Экспрессии GFP у линии Sb5/2 отмечено не было. По результатам GUS окрашивания, в котором линия Sb5/2 выступала в качестве контроля, установлено, что все линии с интеграцией Т-ДНК конструкции pVec035 экспрессируют фермент β-глюкуронидазу (Рис. 3А-В). Контаминации окрашивания в эксперименте обнаружено не было (Рис. 3Г и 3Д).

Исходя из полученных данных, было произведено более детальное изучение влияния регуляторов роста на эффективность трансформации вольфии. В данном эксперименте было задействовано 25 вариантов комбинаций регуляторов роста 2,4-D и ВА (2,4-D в концентрациях 0,5–2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л совместно с ВА в концентрациях 0,5 – 2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л) в трехкратной повторности по 65 чашек Петри (≈ 3250 эксплантов) каждый. Трансформацию проводили с использованием штамма ЕНА105 с интродукцией векторных конструкций pCamHIR и pCamGCSF, содержащих в себе целевые гены, кодирующие дисульфатогирудин-1 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) и селективный ген *hpt*. Гирудин является высоко специфическим прямым ингибитором тромбина, обнаруженным в слюнных железах медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*). ГКСФ является гормоном, стимулирующим формирование колоний белых кровяных телец в костном мозге. В результате было установлено, что наиболее высокая эффективность трансформации наблюдалась при культивировании эксплантов в течение первых двух недель на среде с добавлением 2,4-D 2,0–2,5 мг/л совместно с ВА 2,0 мг/л. В ходе исследований получена 81 линия W. arthiza, из них 34 линии с интеграцией гена ГКСФ человека и 47 линий с интеграцией гена дисульфатогирудина-1.

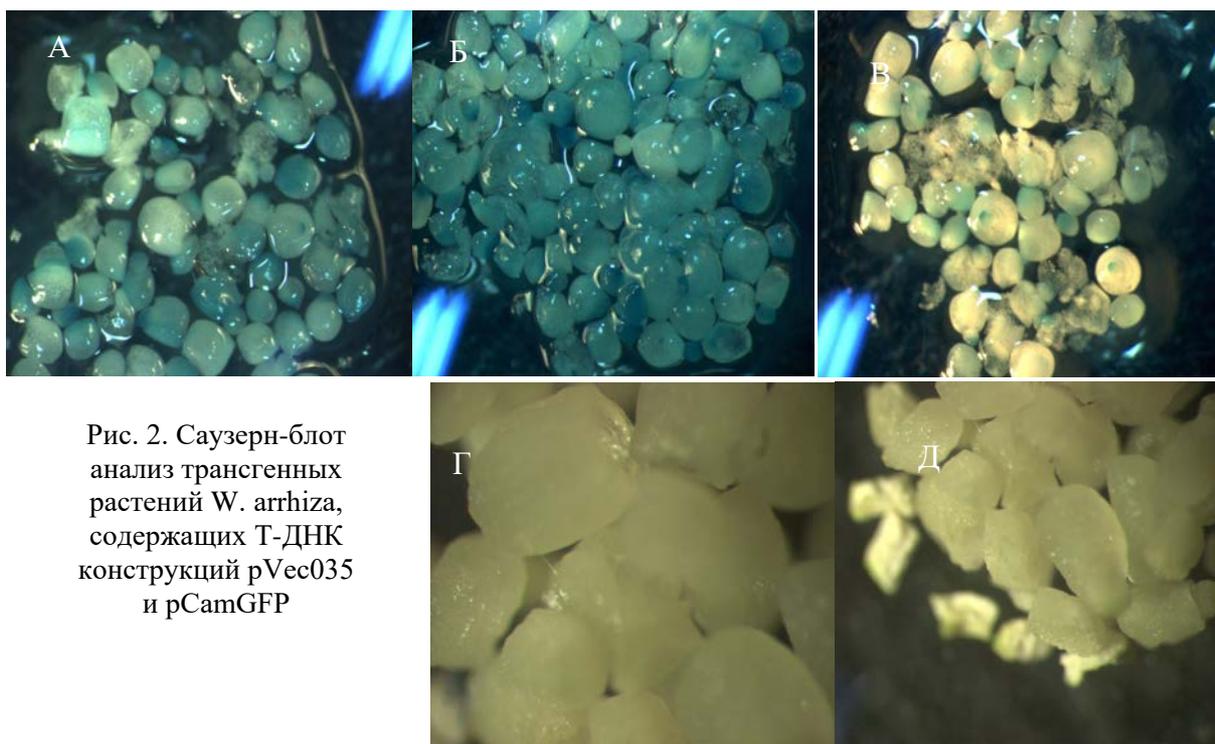


Рис. 2. Саузерн-блот анализ трансгенных растений *W. arrhiza*, содержащих Т-ДНК конструкций pVec035 и pCamGFP

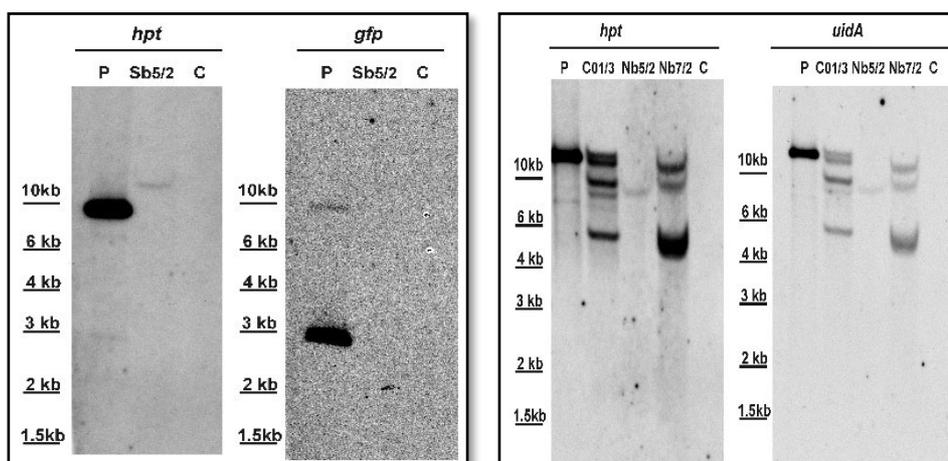


Рис. 3. Результат гистохимического GUS окрашивания, где А – линия Co1/3, Б – линия Nb5/2, В – линия Nb7/2, Г – линия Sb5/2 и Д – не трансгенный контроль.

В результате проведенного вестерн блоттинга и ИФА 34 линий вольфии содержащих в геноме последовательность гена ГКСФ человека были установлены 2 трансгенные линии (WG-04 и WG-32) экспрессирующие рекомбинантный белок ГКСФ на уровне порядка 30 мг/кг сырого веса.