

УДК 575.113.1:577.218:633.71]:615.371

А.П. ФИРСОВ\*, И.В. ТАРАСЕНКО\*, А.С. ПУШИН, Л.А. ШАЛОЙКО, Л.М. ВИНОКУРОВ, С.В. ДОЛГОВ

Филиал Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Московская область, 142290

e-mail: aleksey\_firsov@mail.ru

starassenko@rambler.ru

## Экспрессия в трансгенных растениях табака гена пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансляционном слиянии с субъединицей В рицина

Пептид М2е вируса гриппа птиц H5N1 Curgan 2005 был успешно экспрессирован в трансгенных растениях табака. Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотный участок белка М2 длиной 30 а.о., включающий пептид М2е (М130), была трансляционно слита в рамке считывания с 3'-концом нуклеотидной последовательности субъединицы В рицина в векторе рВ1121. Полученной конструкцией были успешно трансформированы растения табака. С помощью асиалофетин-иммобилизованного ИФА показано присутствие субъединицы В рицина (RTВ) в четырех линиях трансгенных растений из восьми изученных. Присутствие пептида М2е в составе слитого белка RTВ-М130 было подтверждено в двух линиях трансгенных растений, в двух других линиях несмотря на присутствие RTВ пептид М2е не детектировался. Методом количественного ИФА с иммобилизованным асиалофетинном показано, что накопление слитого белка RTВ-М130 составило в этих линиях 3,3 и 2,4 мкг/г сырой массы листьев (0,02% и 0,01% от общего растворимого белка, соответственно). В линиях, где детектировалась экспрессия только гена RTВ, его накопление было равно 2,1 и 2,4 мкг/г сырой массы (0,01 и 0,02% от общего растворимого белка, соответственно). Методом вестерн-блот-анализа показано, что ген белка RTВ-М130 экспрессировался в растениях табака как димер без заметных признаков дегградации. Полученные результаты будут в дальнейшем использованы для разработки на основе трансгенных растений съедобной вакцины против гриппа птиц.

*Ключевые слова:* биофарминг, грипп птиц, пептид М2е, субъединица В рицина, съедобные вакцины.

Одним из динамично развивающихся направлений прикладной молекулярной биологии растений является разработка съедобных вакцин как медицинского, так и ветеринарного назначения. Использование таких вакцин позволяеткратно снизить затраты на их производство и на проведение вакцинации. Эффективность и безопасность вак-

цин, полученных на основе растительных экспрессионных платформ, подтверждена многочисленными исследованиями [1–4].

Грипп птиц — высококонтагиозная вирусная инфекция, которая при неблагоприятных условиях может привести к полной гибели поголовья домашней птицы. Противогриппозные вакцины,

---

Фирсов Алексей Петрович, Тарасенко Ирина Викторовна, Пушин Александр Сергеевич, Шалойко Любовь Анатольевна, Винокуров Леонид Михайлович, Долгов Сергей Владимирович.

*Список сокращений:* а.о. — аминокислотный остаток; БСА — бычий сывороточный альбумин; ИФА — иммуно-ферментный анализ; ОП — оптическая плотность; ОРБ — общий растворимый белок; ПААГ — полиакриламидный гель; ПЦР — полимеразная цепная реакция; среда L В — среда Луриа—Бертани; СТВ — белок холерного токсина; dNTP — дезоксирибонуклеозидтрифосфат(ы); НВ<sub>s</sub>Ag — поверхностный антиген вируса гепатита В; LTV — термолабильный токсин кишечной палочки; PBS — фосфатно-солевой буфер; PBST — буфер PBS с твином-20; RTВ — субъединица В рицина; SDS — додецилсульфат натрия.

\* Авторы для переписки.

действие которых основано на индукции протективных антител против гемагглютинина и нейраминидазы, быстро теряют свою актуальность в силу постоянно действующего антигенного дрейфа. Поэтому интенсивно изучается возможность создания противогриппозной вакцины широкого спектра действия на основе консервативных антигенов других вирусных белков. С точки зрения разработки такой вакцины особый интерес представляет пептид M2e — аминотерминальный экстрамембранный фрагмент белка M2 вируса гриппа длиной 24 а.о.

Белок M2 вируса гриппа — интегральный мембранный белок, который формирует ионный канал; его основная роль состоит в проведении протонов из кислой среды эндосомы внутрь вириона, что приводит к диссоциации рибонуклеотидного комплекса вириона и к его высвобождению из капсида в цитоплазму клетки-хозяина [5]. Правильное функционирование белка M2 критично для репликации вируса, так как блокирование ионного канала препятствует инфицированию вирусом клетки-хозяина.

Пептид M2e является высококонсервативным, его аминокислотная последовательность практически не изменилась с 1918 г. [6]. Эта особенность, а также важная роль в жизненном цикле вируса делают пептид M2e привлекательным объектом для создания универсальной противогриппозной вакцины [7, 8]. К настоящему времени показано, что пептид M2e является иммуногенным и способен вызывать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [9]. Вакцинация лабораторных животных пептидом M2e, слитым химическим или генетическим путем с различными носителями или адъювантами, защищала их от летальных доз вируса гриппа [8, 10, 11].

Однако пептид M2e является слабым иммуногеном [8, 9] и, следовательно, для усиления иммунного ответа необходимо использование адъювантов. Для создания съедобных вакцин в настоящее время чаще всего используют субъединицы Б белков холерного токсина (СТВ) или термолабильного токсина кишечной палочки (ЛТВ), реже — поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) [12]. Другим потенциально эффективным адъювантом является субъединица Б рицина — токсичного белка из семян клещевины *Ricinus communis*.

Рицин представляет собой гликопротеин, построенный из двух субъединиц А и Б, соединенных одной дисульфидной связью. Субъединица Б рицина нетоксична; связываясь с рецепторами клеточных мембран, она обеспечивает последующий транспорт рицина в клетку [13]. Вероятный

механизм адъювантного действия РТВ заключается в клеточной интернализации слитого белка РТВ—антиген по механизму, аналогичному интернализации рицина. Затем слитый белок РТВ—антиген включается во внутриклеточные пути деградации белков с высвобождением антигена, который далее попадает в антиген-презентирующие клетки [14, 15]. Кроме того, адъювантные свойства РТВ могут быть частично обусловлены патоген-ассоциированными мотивами, представленными в ее молекуле, которые дополнительно стимулируют поглощение, процессинг и презентацию антигена на поверхности Т-хелперных клеток [16—18].

Адъювантные свойства рекомбинантной субъединицы Б рицина, полученной в экспрессионной системе на основе *E. coli*, были подтверждены, в частности, при ее слиянии с ротавирусным белком NSP4 [19], белком оболочки вируса иммунодефицита человека р24 [20] и др. При экспрессии гена субъединицы Б рицина в трансгенных растениях табака ее адъювантные свойства также полностью сохранялись [21]. Таким образом, субъединица Б рицина является потенциально перспективным адъювантом для разработки съедобных вакцин на основе трансгенных растений.

Целью данного исследования являлось изучение особенностей экспрессии в трансгенных растениях табака пептида M2e в трансляционном слиянии с субъединицей Б рицина, включая клонирование нуклеотидной последовательности субъединицы Б рицина, получение трансгенных растений и количественную оценку накопления слитого белка РТВ—пептид M2e.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Выделение ДНК из растительных тканей.** Выделение геномной ДНК табака *Nicotiana tabacum* и клещевины *R. communis* проводили по методу [22].

**Молекулярное клонирование.** Все энзиматические манипуляции с ДНК осуществляли с использованием ферментов и соответствующих буферов компании Fermentas (Литва) по рекомендациям производителя.

ПЦР при клонировании нуклеотидной последовательности РТВ и конструировании векторов проводили в буфере следующего состава: однократный буфер для ДНК-полимеразы *Pfu* с  $MgSO_4$  (Helicon, Россия), содержащий каждый dNTP в концентрации 0,2 мМ. В пробы вносили 0,2 мкмоль каждого праймера, 0,5 единицы ДНК-полимеразы *Pfu*; объем реакционной смеси составлял 50 мкл, количество циклов амплифика-

ции — 30. Полученные рекомбинантные плазмиды переносили трансформацией в *E. coli* DH5 $\alpha$ , трансформанты культивировали на среде LB (приготовлена из компонентов от Helicon), содержащей 50 мг/л ампициллина («Нижфарм», Россия) (вектор pUC18) или канамицина («Нижфарм») (вектор pBI121).

ПЦР-анализ препаратов геномной ДНК трансгенных растений проводили в буфере следующего состава: однократный буфер для *Taq*-полимеразы с (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, содержащий 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Helicon); и каждый dNTP в концентрации 0,2 mM. Пробы содержали 0,5 мкмоль каждого праймера, 1 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы, 3 мкл препарата геномной ДНК; объем реакционной смеси составлял 25 мкл, количество циклов амплификации — 25.

Фрагменты ДНК амплифицировали при следующих условиях: предварительная денатурация — 95°, 5 мин; денатурация — 95°, 30 с; температура и длительность отжига праймеров, длительность элонгации цепи ДНК (72°) — в зависимости от использованных праймеров (таблица).

**Клонирование нуклеотидной последовательности субъединицы Б рибина.** ПЦР-амплификация нуклеотидной последовательности RTB была проведена с использованием праймеров RTB-F и RTB-R, в последовательность которых для дальнейшего клонирования были добавлены сайты рестрикции *Xba*I и *Sac*I, соответственно. В качестве

матрицы использовали геномную ДНК, выделенную из листьев клещевины. Полученные ПЦР-фрагменты обрабатывали рестриктазами *Xba*I и *Sac*I (Fermentas) и клонировали в векторе pUC18 по этим сайтам. Нуклеотидная последовательность вставки в полученных плазидах была определена с использованием праймеров для секвенирования M13/pUC (Fermentas).

**Конструирование вектора для трансформации растений pBIM130RTB.** Для экспрессии в трансгенных растениях табака был выбран аминокотерминальный фрагмент белка M2 вируса гриппа птиц A/chicken/Curgan/05/2005 H5N1 (GenBank DQ449633.1) длиной 30 а.о. (далее обозначен как M130) с оптимизированным для экспрессии в растениях кодонным составом [23]. Нуклеотидную последовательность, кодирующую M130, амплифицировали методом ПЦР с применением праймеров M130-F и M130-R, используя в качестве матрицы вектор pUC19/143 [23], обрабатывали рестриктазами *Xba*I и *Sac*I и клонировали по этим сайтам в векторе pBI121 (ClonTech, США) вместо гена  $\beta$ -глюкуронидазы.

Нуклеотидная последовательность RTB была клонирована в полученном векторе в одной рамке считывания с 5'-концом нуклеотидной последовательности M130. Для этого последовательность RTB была амплифицирована с использованием праймеров RBin-F и RBin-R, а также плазмиды

### Режим ПЦР и нуклеотидная последовательность использованных праймеров

Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Температура и длительность отжига праймеров; время элонгации цепи
RTB-F	cgtctagagctgatgtttgtatggatcctgag, прямой	63°, 30 с; 2 мин
RTB-R	cgtgagctcctgcaagagagtaactgtctatca, обратный	
M130-F	catctagaatgtccctcctcactgaag, прямой	62с, 30 с; 30 с
M130-R	gggatcccgcgcccaccaccaaggggt, обратный	
RBin-F	gtcgactctagaaccgggtgctgatgtttgtatgga, прямой	63°, 30 с; 2 мин
RBin-R	ccgtaactctagaaaataatggtaaccatattgg, обратный	
RBsp-F	agaaccgggtatgggattgttctcttttc, прямой	57с, 30 с; 30 с
RBsp-R	agcaccggtagaattttgggacacgg, обратный	
5727	aagggatgacgcacaatc, прямой	56с, 30 с; 1 мин — праймеры RBin-R и M130-R, 30 с — RBsp-R

pUC18RTB в качестве матрицы. В последовательность праймера RBin-F был введен уникальный сайт рестрикции *AsiAI*, далее использованный для клонирования нуклеотидной последовательности N-концевого сигнального пептида PR1a. Амплифицированная нуклеотидная последовательность RTB и вектор pBI121 с клонированной в нем последовательностью M130 были гидролизованы рестриктазой *XbaI*, и фрагменты затем лигированы друг с другом.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая N-концевой сигнальный пептид белка PR1a табака (GenBank X12737), была амплифицирована с помощью праймеров RBsp-F и RBsp-R, содержащих сайт рестрикции *AsiAI*; в качестве матрицы была использована геномная ДНК табака. Амплифицированный фрагмент PR1a гидролизовали рестриктазой *AsiAI* и клонировали по этому сайту в одной рамке считывания с 5'-концом последовательности RTB; в результате был получен вектор для трансформации растений pBIM130RTB. Корректность клонирования нуклеотидной последовательности PR1a-RTB-M130 в векторе pBI121 была подтверждена секвенированием с использованием праймеров 5727 и M130-R. Полученный вектор pBIM130RTB был перенесен в *Agrobacterium tumefaciens* CBE 21 и использован для трансформации растений табака.

**Агробактериальная трансформация растений табака и ПЦР-анализ трансформантов.** Для генетической трансформации были использованы растения табака *Nicotiana tabacum* L. cv. Petite Havana SR1; трансформацию растений табака осуществляли по методу [24]. ПЦР-анализ препаратов геномной ДНК проводили с использованием праймеров 5727 и M130-R.

**ИФА с иммобилизованным асиалофетуином.** Определение содержания слитого белка RTB-M130 в трансгенных растениях проводили по протоколу [25]. В качестве твердофазной матрицы был использован адсорбированный в иммунологических планшетах гликопротеин асиалофетуин.

Асиалофетуин (Sigma, США) в 0,1 М карбонат/бикарбонатном буфере (pH 9,6; 4 мг/мл асиалофетуина) наносили на иммунологический планшет (100 мкл/лунку) и инкубировали при 4° в течение 18 ч. Далее лунки промывали буфером PBST (буфер PBS — 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (соли производства Helicon), pH 7,4, содержащий 0,05% твина-20, (BioRad)) трижды по 5 мин при 37°. Блокирование с использованием 1% БСА (Sigma) проводили в течение 1 ч при 37° в буфере PBST. Анализируемые

образцы наносили в объеме 100 мкл/лунку в планшеты с иммобилизованным асиалофетуином, инкубировали 1 ч при 37° и промывали. Далее в лунки добавляли кроличьи поликлональные антитела к субъединице Б рицина или к пептиду M2e (AbCam, Великобритания), инкубировали, промывали и добавляли антикроличьи IgG, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Pierce, США). Антитела разводили в блокировочном буфере в соотношении 1:1000 для первичных и 1:2000 для вторичных антител и наносили по 100 мкл/лунку. Инкубацию с антителами осуществляли в течение 1 ч при температуре 37°. После отмывки от вторичных антител добавляли субстрат для щелочной фосфатазы (Phosphatase Substrate Kit, Pierce, США). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 15 мин, ОП препаратов измеряли при длине волны 405 нм.

**Выделение белка из растертых в жидком азоте растительных тканей** проводили непосредственно перед нанесением в лунки иммунологического планшета. Белок экстрагировали буфером PBST (соотношение масса образца/объем буфера равно 1:1) при 4° в течение 40 мин. Обломки клеток осаждали центрифугированием при 16000 g и 4°, супернатант отбирали и наносили на планшет по 100 мкл/лунку. Определение количества общего растворимого белка в препаратах проводили с использованием DC protein assay kit (BioRad, США).

В качестве стандарта для количественной оценки синтеза целевого белка в трансгенных растениях был использован рицин, выделенный из семян клещевины [26]. Количество слитого белка RTB-M130 было вычислено исходя из графика концентрационной зависимости связывания рицина с иммобилизованным асиалофетуином с учетом разницы значений молекулярной массы RTB-M130 и рицина (32,6 кДа и 64,2 кДа, соответственно).

**Аффинная хроматография с иммобилизованным асиалофетуином.** Взаимодействие между асиалофетуином и слитым белком RTB-M130 изучали методом [20]. Асиалофетуин (5 мг) был иммобилизован на 1,5 г BtCN-сефарозы 4B (Sigma) в соответствии с инструкцией производителя сефарозы. После отмывки (попеременно 0,1 М буферными растворами с pH 4,0 и 8,3) сефароза 4B с иммобилизованным асиалофетуином в объеме 5 мл была помещена в колонку размером 1,5 Ч 7 см и переведена в буфер PBS.

Листья трансгенного табака линии sp3 (25 г) замораживали в жидком азоте и растирали в ступке пестиком. Общий белок из полученного материала экстрагировали 25 мл буфера PBS в течение

45 мин при температуре 4°, затем центрифугировали 30 мин (16000 g, 4°) и отбирали супернатант (30 мл), который наносили на полученную аффинную колонку; промывку последней и элюцию протеинов проводили в соответствии с [20].

Связавшиеся с асиалофетуином белки элюировали с колонки 100 мМ глицином, pH 4,0. Фракции (по 1 мл) собирали в пробирки, содержащие нейтрализующий pH буфер (100 мМ трис-HCl, pH 9,0) и анализировали методом вестерн-блот-анализа.

**Вестерн-блот-анализ.** Электрофорез белков проводили в 12%-ном SDS-ПААГ. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad) и блокировали обезжиренным сухим молоком (4%) (BioRad) с 0,05% твина-20 в буфере PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Для детекции пептида M2e были использованы кроличьи поликлональные антитела в разведении 1:500 (Abscam, Великобритания), а субъединицы Б рибина — кроличьи поликлональные антитела в разведении 1:1000 (Abscam). В качестве вторичных антител использовали антикроличьи IgG, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Pierce), разведенные в блокировочном буфере (см. выше) в соотношении 1:3000. Гибридизацию с первичными антителами проводили при 4° в течение ночи, а с вторичными — в течение 1 ч при комнатной температуре. Изображение на мембранах получали с помощью хромогенного субстрата BCIP/NBT (Fermentas).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Клонирование нуклеотидной последовательности субъединицы Б рибина

В результате клонирования были получены клоны *E.coli*, содержащие вектор pUC18 с полно-

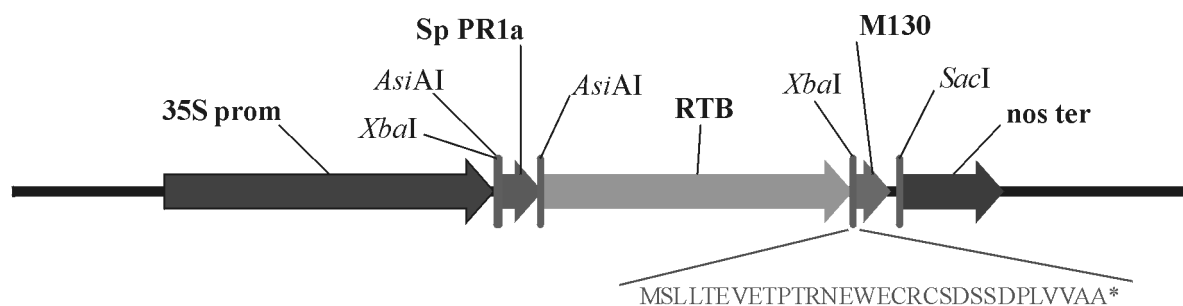
размерной вставкой нуклеотидной последовательности RTB, которая была определена в четырех клонах с помощью сиквенирования.

Сравнение клонированной нами последовательности с последовательностями RTB из базы данных GenBank показало, что в полученных клонах нуклеотидные и аминокислотные последовательности RTB полностью совпадали с большинством последовательностей, представленных в базе данных (ADG29117; CAA26939; CAA37095; EEF27734; AFH96941 и др.). В то же время, клонированная нами последовательность RTB отличалась на 15 нуклеотидных остатков (10 аминокислотных замен) от последовательности, представленной Mahrous с соавт. (GenBank ACY38598.1), что может быть связано с генетическими различиями использованных для исследований сортов клешиины. В результате для дальнейшей работы был отобран один из четырех клонов, далее обозначенный как pUC18RTB.

### Конструирование вектора для трансформации растений рВIM130RTB; получение трансгенных растений табака

Нами был сконструирован вектор рВIM130RTB, несущий нуклеотидную последовательность пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1 в одной рамке считывания с 3'-концом субъединицы Б рибина. Для транспорта слитого белка M130-RTB в эндоплазматический ретикулум к 5'-концу RTB была добавлена нуклеотидная последовательность N-концевого сигнального пептида белка PR1a табака. Структура экспрессионной кассеты вектора рВIM130RTB представлена на рис. 1.

В результате агробактериальной трансформации было получено 15 независимых канамицин-устойчивых линий табака. ПЦР-анализ геном-



**Рис. 1.** Структура гена, кодирующего слитый белок RTB-M130: показана аминокислотная последовательность фрагмента M130; последовательность пептида M2e подчеркнута; 35S prom — промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, nos ter — терминальный код гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*. Указаны сайты рестрикции, использованные для клонирования

ной ДНК полученных линий показал отсутствие агробактериальной контаминации в 14 линиях (данные не представлены). Для подтверждения трансгенной природы этих линий был проведен ПЦР-анализ геномной ДНК с использованием праймеров 5727 и M130-R (при этом амплифицировался фрагмент, содержащий полноразмерную нуклеотидную последовательность слитого белка PR1a-RTB-M130, рис. 2). В результате было отобрано восемь линий трансгенных растений, содержащих целевую последовательность. Отобранные линии табака были укоренены и перенесены в теплицу для выращивания.

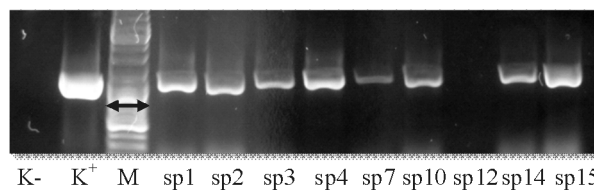
### Анализ экспрессии слитого белка RTB-M130 в трансгенных растениях

Анализ общего белка препаратов трансгенных растений табака с помощью ИФА с иммобилизованным асиалофетуином показал присутствие RTB в четырех линиях трансгенных растений (sp1, sp3, sp4 и sp14) из 8 проанализированных (рис. 3, А; использованы антитела к субъединице Б рицина). В других 4 трансгенных линиях (sp2, sp7, sp10 и sp15) присутствие RTB не детектировалось (см. рис. 3, А).

При использовании антител к пептиду M2e присутствие последовательности M130 в составе слитого белка было подтверждено только в двух линиях трансгенных растений — sp3 и sp14 (см. рис. 3, Б). В линиях sp1 и sp4 несмотря на присутствие RTB пептид M2e не детектировался. В нетрансформированных контрольных растениях пептид M2e, так же как и субъединица Б рицина, выявлен не был (см. рис. 3, А, Б).

Количество слитого белка RTB-M130 в трансгенных растениях табака было определено методом количественного ИФА с иммобилизованным асиалофетуином с использованием антител к RTB (см. рис. 3, В). У линии sp3 количество белка RTB-M130 составило 3,3 мкг на 1 г сырой массы листьев, у линии sp14 — 2,4 мкг/г сырой массы (0,02% и 0,01% общего растворимого белка (ОРБ), соответственно). У линий sp1 и sp4 содержание функционального эквивалента RTB составило 2,1 и 2,8 мкг/г сырой массы (0,01 и 0,02% ОРБ, соответственно).

Для дальнейшего изучения экспрессии гена слитого белка RTB-M130 в трансгенных растениях была проведена частичная очистка грубого препарата общего белка табака линии sp3 методом аффинной хроматографии с использованием асиалофетуина, иммобилизованного на BrCN-сефарозе 4В. Вестерн-блот-анализ полученных фрак-

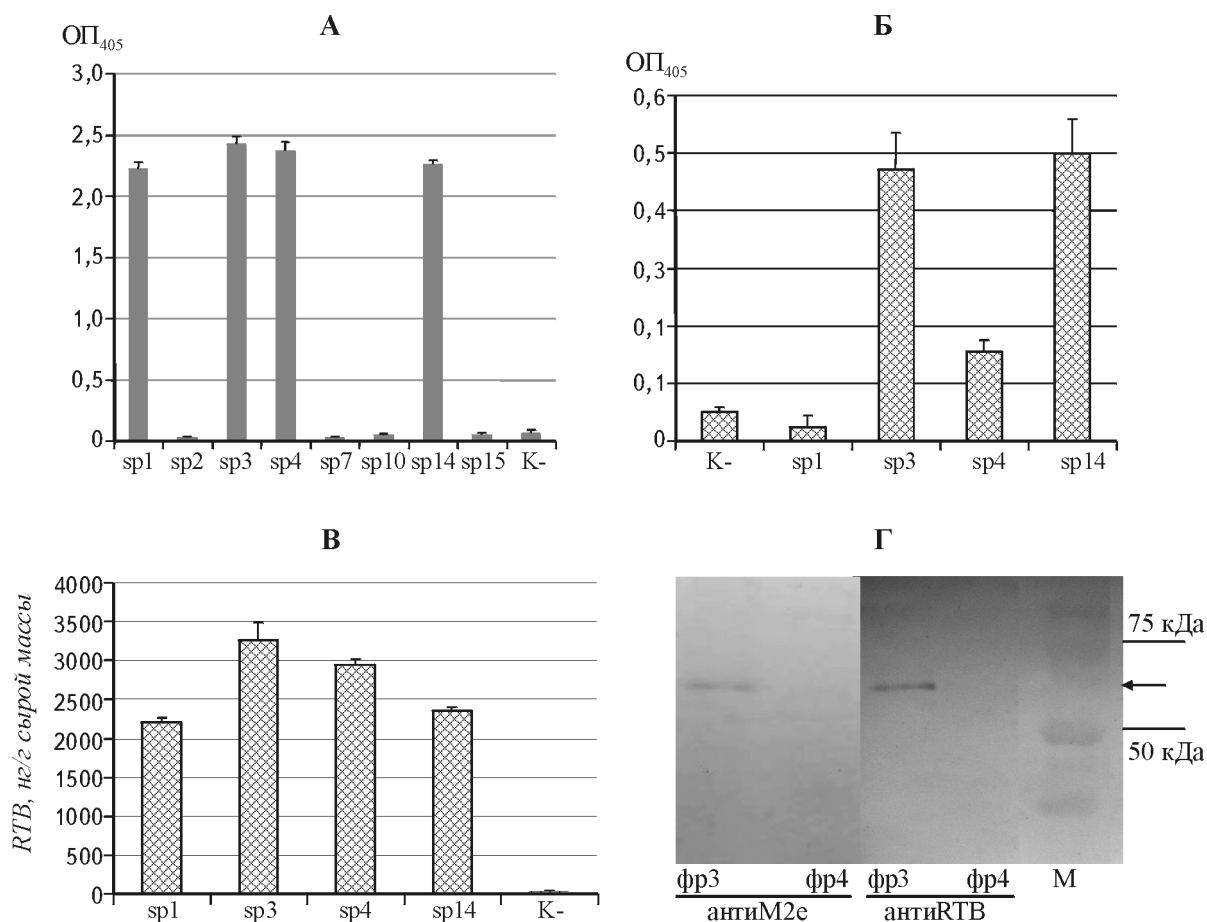


**Рис. 2** ПЦР-анализ геномной ДНК некоторых линий табака, трансформированных вектором pVIM130RTB: K- — геномная ДНК нетрансгенного табака; K+ — плазмида pVIM130RTB; sp1 — sp4, sp7, sp10, sp12, sp14 и sp15 — линии трансгенных растений табака; M — ДНК-маркеры молекулярной массы (Fermentas); стрелкой указан маркер 1000 п.н. Ожидаемая длина фрагмента — 1091 н.п.

ций с использованием антител к пептиду M2e или к RTB показал присутствие во фракции 3 иммунореактивной полосы массой 60—65 кДа (расчетная масса белка RTB-M130 без N-концевого сигнала — 32,6 кДа), в остальных 9 фракциях целевой белок не детектировался (см. рис. 3, Г). Слитый белок выявлялся как единичная полоса без признаков деградации белка.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были получены 8 трансгенных линий табака, трансформированных нуклеотидной последовательностью, кодирующей слитый белок PR1a-RTB-M130. Субъединица Б рицина детектировалась в четырех трансгенных линиях (sp1, sp3, sp4 и sp14), в четырех других линиях экспрессия RTB не происходила или находилась на недетектируемом уровне. Присутствие целевого пептида M2e было показано в двух линиях трансгенного табака — sp3 и sp14, а в двух других линиях несмотря на экспрессию RTB пептид M2e не детектировался. Наиболее вероятно, что отсутствие пептида M2e в этих линиях связано с неполным переносом 3'-концевой части нуклеотидной последовательности слитого белка PR1a-RTB-M130 в процессе агробактериальной трансформации. Эта часть гена находится наиболее близко к левому граничному повтору T-ДНК, т.е. в той ее части T-ДНК, где наиболее вероятен обрыв T-ДНК в процессе ее переноса из агробактериальной клетки в растительную. Необходимо отметить, что трансгенные растения всех линий нормально росли и развивались, не отличаясь по своим морфологическим признакам от контрольных нетрансформированных растений. Таким образом, рекомбинантная субъединица Б рицина не оказывала на трансгенные растения отрицательного эффекта.

Количество рекомбинантного RTB в трансгенных растениях составляло 2—3 мкг на 1 г сырой массы листьев (0,01—0,02% от ОРБ). Такой



**Рис. 3.** Анализ экспрессии гена слитого белка RTB-M130 в трансгенных растениях табака с помощью ИФА с иммобилизованным асиалофетуином и вестерн-блот-анализа: А — детекция слитого белка RTB-M130 с использованием антител к субъединице Б рибцина; Б — детекция слитого белка RTB-M130 с использованием антител к пептиду M2e; В — накопление слитого белка RTB-M130, определенное методом количественного ИФА с иммобилизованным асиалофетуином (использованы антитела к RTB); Г — вестерн-блоттинг фракций 3 и 4, полученных после частичной очистки препарата общего белка табака линии sp3 методом аффинной хроматографии с использованием антител к пептиду M2e и к RTB; sp1—sp15 — линии трансгенных растений табака; К — нетрансгенное растение табака; М — маркеры молекулярной массы (Fermentas). Стрелкой показан слитый белок RTB-M130

относительно невысокий уровень, по-видимому, является характерным для экспрессии гена RTB в ядерно-трансформированных гетерологичных системах.

Например, по данным Reed с соавт. [27], накопление RTB в трансгенных растениях табака составило в среднем 0,007% от ОРБ (около 0,4 мкг функционального эквивалента RTB на 1 г сырой массы листьев). В работе Woffenden с соавт. [28] растения табака были трансформированы нуклеотидной последовательностью RTB в трансляционном слиянии с синтетическими генами F1 и V *Yersinia pestis*. Полученный слитый белок RTB:F1:V накапливался в листьях трансгенных растений на уровне 45 нг функционального эквивалента RTB

на 1 г сырой массы листьев (что соответствовало 0,0015—0,0025% от ОРБ). Несколько более высокий уровень экспрессии RTB наблюдался в исследовании Choi с соавт. [29] — до 0,03% функционального эквивалента RTB от ОРБ. В этой работе субъединица Б рибцина была слита с С-концом капсидного гликопротеина VP7 ротавируса обезьян SA11; слитый белок VP7::RTB был экспрессирован в клубнях картофеля. Во всех этих исследованиях субъединица Б рибцина, как следует из результатов ИФА с иммобилизованным асиалофетуином, была функционально активна, что указывает на ее правильные процессинг и гликозилирование в гетерологичных растительных системах. В то же время, при трансформации табака кДНК, коди-

рующей полноразмерный препроин, накопление рицина в листовых тканях табака составило до 0,25% от ОРБ [30]. Аккумуляция рицина в этом случае происходила в вакуолях. В экспериментах Reed [27] и Woffenden [28] рекомбинантная RTB транспортировалась в апопластное пространство, а в работе Choi [29] — удерживался в эндоплазматическом ретикулуме. Возможно, что эти компартменты не являются оптимальными для накопления рекомбинантной RTB. Учитывая, что накопление рицина в клещевине происходит в запасающих вакуолях эндосперма семян, транспорт рекомбинантной RTB в вакуоли, вероятно, может повысить уровень его накопления при экспрессии соответствующего гена в гетерологичных системах.

В наших экспериментах слитый белок RTB-M130 детектировался в виде полосы массой около 65 кДа (см. рис. 3, Г) (расчетная масса белка без N-концевого сигнального пептида составляет 32,6 кДа), т.е. предположительно в виде димера. Похожий характер экспрессии гена RTB в составе слитого белка наблюдался в исследовании Carter с соавт. [31]. В этой работе нуклеотидная последовательность субъединицы Б рицина была экспрессирована в слиянии с C-концом проинсулина (Ins) в трансгенных клубнях картофеля. Методом вестерн-блот-анализа с использованием специфических антител было показано, что слитый белок Ins-RTB, по-видимому, агрегирует в большие молекулярные комплексы и детектируется в виде полос массой более 200 кДа (расчетная масса Ins-RTB с N-концевым сигнальным пептидом  $\beta$ -фазеолина — 40,8 кДа). Попытки диссоциировать эти агрегаты с образованием белка расчетной массы были неудачны. По мнению авторов, агрегация слитого белка Ins-RTB происходит за счет образования большого количества хаотичных межмолекулярных дисульфидных связей. Тем не менее, Ins-RTB сохранял способность связываться с асиалофетуином, т.е. свою функциональную активность [31]. В наших экспериментах слитый белок RTB-M130, по результатам ИФА с иммобилизованным асиалофетуином, также сохранял свою функциональную активность. Таким образом, димеризация (агрегирование) RTB не влияла на ее способность связываться с галактозой в составе асиалофетуина, т.е. на способность ассоциировать с соответствующими клеточными рецепторами.

Необходимо отметить, что агрегация наблюдалась только в случаях, когда RTB сливали с небольшими белками — пептидом M130 (3,3 кДа) или проинсулином (9,4 кДа; [31]). В случаях, когда партнером RTB в слитом белке выступал отно-

сительно крупный белок — VP7 (молекулярная масса 34 кДа [29]), белки F1 и V (15 и 37 кДа, соответственно [28]) и GFP (26 кДа [21]) или экспрессировался только ген RTB [27], агрегации слитого белка не наблюдали; он детектировался в виде одной полосы ожидаемой молекулярной массы. Возможно, что оптимизация размера и последовательности партнера RTB в слитом белке позволит избежать или существенно уменьшить степень его агрегации при экспрессии соответствующего гена в гетерологичных системах.

Таким образом, в результате проведенных исследований показана возможность экспрессии в трансгенных растениях табака нуклеотидной последовательности пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1 в слиянии с субъединицей Б рицина и подтверждена функциональная активность полученного слитого белка. Трансгенные растения будут использованы для оценки способности белка RTB-M130 индуцировать иммунный ответ у лабораторных животных и в дальнейшем — для разработки съедобной вакцины против гриппа птиц.

Авторы выражают благодарность акад. РАН О.И. Киселеву и к.м.н. М.П. Грудинину (НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург) за ценную методическую и практическую помощь в проведении работы.

Работа была выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки Российской Федерации № 14.B25.31.0027 с использованием уникальной научной установки «ФИТОТРОН».

Получено 10.03.15

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Yusibov, V.M. Plants as an alternative system for expression of vaccine antigens / V. M. Yusibov, T. G. Mamedov // Proc. ANAS (Biol. Sci.) — 2010. — V. 65(5—6). — P. 195—200.
2. Obembe, O.O. Advances in plant molecular farming / O.O. Obembe, J. O. Popoola, S. Leelavathi, S. V. Reddy // Biotechnol. Adv. — 2011. — V. 29. — P. 210—222.
3. Doshi, V. Edible vaccines from GM crops: current status and future scope / V. Doshi, H. Rawal, S. J. Mukherjee // Pharm. Sci. Innov. — 2013. — V. 2(3). — P. 1—6.
4. Jacob, S.S. Edible vaccines against veterinary parasitic diseases — current status and future prospects / S. S. Jacob, S. Cherran, T. G. Sumithra, O. K. Raina, M. Sankar // Vaccine. — 2013. — V. 31(15). — P. 1879—1885.
5. Knipe, D. Fields Virology. — 5th ed. — Lippincott: Williams and Wilkins, 2007.



6. *Tumpey, T.M.* Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus / T. M. Tumpey, C. F. Basler, P. V. Aguilar, H. Zeng, A. Solórzano, D. E. Swayne // *Science*. — 2005. — V.310 (5745). — P. 77—80.
7. *Ma, Ch.* Identification of the functional core of the influenza A virus A/M2 proton-selective ion channel / Ch. Ma, A. Polishchuk, Yu. Ohigashia, A. Stoufferb, A. Schön, E. Magavern, X. Jing, J. D. Lear, E. Freire, R. A. Lamb, W. F. DeGrado, L. H. Pinto // *PNAS*. — 2009. — V.106. — P.12283—12288.
8. *Schotsaert, M.* Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments / M. Schotsaert, M. De Filette, W. Fiers, X. Saelens // *Expert Rev. Vac.* — 2009. — V. 8. — N. 4. — P. 499—508.
9. *Wu, F.* Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus / F. Wu, J. Huang, X. Yuan, W. Huang, Y. Chen // *Vaccine*. — 2007. — V. 25. — N. 52. — P. 8868—8873.
10. *De Filette, M.* An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2 / M. De Filette, W. Martens, K. Roose, T. Deroo, F. Vervalle, M. Bentahir, J. Vandekerckhove, W. Fiers, X. Saelens // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 283. — N. 17. — P. 11382—11387.
11. *Zhao, G.* An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses / G. Zhao, Y. Lin, L. Du, J. Guan, S. Sun, H. Sui, Z. Kou, C. Chan, Y. Guo, S. Jiang, B. Zheng, Y. Zhou // *Virology*. — 2010. — V. 7. — N. 9. — P. 151—157.
12. *Tiwari, S.* Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens / S. Tiwari, P. S. Verma, P. K. Singh, R. Tuli // *Bio-technol. Adv.* — 2009. — V. 27. — P. 449—467.
13. *Lord, J. M.* Ricin Trafficking in Plant and Mammalian Cells / J. M. Lord, R.A. Spooner // *Toxins*. — 2011. — V.3. — P.787—801.
14. *Thorpe, S. C.* The effect of the castor bean toxin, ricin on rat IgE and IgG responses / S. C. Thorpe, R. D. Murdoch, D. M. Kemeny // *Immunology*. — 1989. — V.68. — P. 307—311.
15. *Liu, W.* Immunomodulatory activity of recombinant ricin toxin binding subunit B (RTB) / W. Liu, N. Xu, H. Yuan, S. Li, L. Liu, Z. Pu, J. Wan, H. Wang, Y. Chang, R. Li // *Int. J. Mol. Sci.* — 2013. — V. 14. — N. 6. — P. 12401—12410.
16. *Kaiserlian, D.* Antigen sampling and presentation by epithelial cells in mucosal tissues // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* — 1999. — V. 236. — P.55—78.
17. *Blumberg, H.G.* Antigen presentation by intestinal epithelial cells / H. G. Blumberg, W.I. Lencer, X. Zhu, H.S. Kim, S. Claypool, S.P. Balk // *Immunol. Lett.* — 1999. — V. 69. — P.7—11.
18. *Barton, G.M.* Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors / G. M. Barton, R. Merzhiton // *Curr. Opin. Immunol.* — 2002. — V.14. — P. 380—383.
19. *Choi, N.-W.* Ricin toxin B subunit enhancement of rotavirus NSP4 immunogenicity in mice / N.-W. Choi, M. K. Estes, W.H.R. Langridge // *Viral Immunol.* — 2006. — V. 19. — N. 1. — P. 54—63.
20. *Donayre-Torres, A.J.* Production and purification of immunologically active core protein p24 from HIV-1 fused to ricin toxin B subunit in *E. coli* / A. J. Donayre-Torres, E. Esquivel-Soto, M. de Lourdes Gutierrez-Xicotencatl, F. R. Esquivel-Guadarrama, M. A. Gómez-Lim // *Virology*. — 2009. — V. 6. — N. 17. — P. 1—11.
21. *Medina-Bolivar, F.* A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines / F. A. Medina-Bolivar, R. Wrighta, V. Funka, D. Sentza, L. Barroso, T. D. Wilkins, W. Jr. Petri, C. L. Cramer // *Vaccine*. — 2003. — V. 21. — N. 9—10. — P. 997—1005.
22. *Rogers, S.O., Bendich, A.J.* Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi: *Plant Molecular Biology Manual*. V. 2. [Eds. S. B. Gelvin, R. A. Schilperoort]. — Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. — P. 1—8.
23. *Tarasenko, I.V.* Expression of the nucleotide sequence for the M2e peptide of avian influenza virus in transgenic tobacco plants / I. V. Tarasenko, A. I. Taranov, A. P. Firsov, S. V. Dolgov // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 2013. — V.49. — N. 8. — P. 695—701.
24. *Horsch, R.B.* A simple and general method for transferring genes into plants / R. B. Horsch, J. E. Fry, N. L. Hofmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers, R. T. Fraley // *Science*. — 1985. — V. 227. — P. 1229—1231.
25. *Dawson, R. M.* Characterization of the asialofetuin microtitre plate-binding assay for evaluating inhibitors of ricin lectin activity / R. M. Dawson, B. M. Paddle, M. R. Alderton // *J. Appl. Toxicol.* — 1999. — V. 19. — P. 307—312.
26. *Waller, G.R.* Isolation of ricin, ricinine, and the allergenic fraction from castor seed pomace from two different sources / G. R. Waller, S. S. Negi // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* — 1958. — V. 35. — Issue 8. — P. 409—412.
27. *Reed, D.G.* Expression of functional hexahistidine-tagged ricin B in tobacco / D. G. Reed, L. H. Nopo-Olazabal, V. Funk, B. J. Woffenden, M. J. Reidy, M. C. Dolan, C. L. Cramer, F. Medina-Bolivar // *Plant. Cell Rep.* — 2005. — V. 24. — P.15—24.
28. *Woffenden, B.J.* Expression of a ricin B:F1:V fusion protein in tobacco hairy roots: steps toward a novel pneumonic plague vaccine / B. J. Woffenden, L. H. Nopo, C. L. Cramer, M. C. Dolan, F. Medina-Bolivar // *Electronic J. Int. Biosci.* — 2008. — V. 3. — N.1. — P.10—19.
29. *Choi, N.-W.* Synthesis of a ricin toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in potato / N.-W. Choi, M. K. Estes, W. H. R. Langridge // *Mol. Biotech.* — 2006. — V. 32. — P. 117—127.
30. *Sehnke, P.C.* Expression of active, processed ricin in transgenic tobacco / P. C. Sehnke, L. Pedrosa, A.-L. Paul, A. E. Franke, R. J. Ferl // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V. 269. — N. 36. — Issue of September 9. — P. 22473—22476.
31. *Carter, J.E.* Expression of a ricin toxin B subunit: insulin fusion protein in edible plant tissues / J. E. Carter, O. Odumusu, W. H. R. Langridge // *Mol. Biotech.* — 2010. — V. 44. — P. 90—100.

A.P. FIRSOV\*, I.V. TARASENKO\*, A.S. PUSHIN,  
L.A. SHALOIKO, L.M. VINOKUROV, and S.V. DOLGOV

The Institute for Bioorganic Chemistry, Russ. Acad. Sci., Pushchino branch, 142290, Pushchino, Moskovskaya oblast Russia

*e-mail:* aleksey\_firsov@mail.ru

starassenko@rambler.ru

### Expression in Tobacco Transgenic Plants of a Gene for M2e Peptide of H5N1 Avian Influenza Virus in Translational Fusion with Ricin B Subunit

The M2e peptide of avian influenza virus H5N1 Curgan 2005 has successfully been expressed in transgenic tobacco plants. The nucleotide sequence encoding the amino-terminal fragment of the protein M2, 30 a.a. in size that included the M2e peptide (M130) was translationally fused within the reading fra-

me with the 3'-terminus of the ricin B subunit (RTB) sequence in vector pBI121. Tobacco plants were successfully transformed with the obtained construct. The RTB was detected in 4 lines of the transgenic plants from the 8 studied using asialofetuin-immobilized ELISA. The presence of the M2e peptide in the fused protein RTB-M130 was confirmed in two lines of the transgenic plants; in 2 other lines M2e was not detected regardless of the presence of RTB. The quantitative asialofetuin-immobilized ELISA permitted to show that the accumulation of the fused protein RTB-M130 in those lines was equal to 3.3 and 2.4 µg per 1 g of leaf fresh weight (0.02% and 0.01% of total soluble protein, respectively). The lines in which the expression of the RTB gene was only detected were characterized by the RTB accumulation of 2.1 and 2.4 µg per 1 g of fresh weight (0.01 and 0.02% of the total soluble protein, respectively). Western blot analysis showed that the RTB-M130 protein was detected in the transgenic tobacco lines as a dimer without significant signs of degradation. The obtained results will be further used for the design of a plant-based edible vaccine against avian influenza.

*Key words:* avian influenza, edible vaccines, molecular farming, peptide M2e, ricin B subunit.

---

\*Authors for correspondence.