

**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЕ
ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫЙ ИНТЕРФЕРОН $\alpha 2b$ ЧЕЛОВЕКА**

Шелудько Ю.В.¹, Герасименко И.М.¹, Щербак Н.Л.¹, Сахно Л.А.¹, Липовая Н.Н.¹, Синдаровская Я.Р.¹, Олевинская З.М.², Клестова З.С.³, Спивак Н.Я.², Кучук Н.В.¹

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, г. Киев

² Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, г. Киев

³ Институт ветеринарной медицины УААН, г. Киев

В статье описано получение и анализ растений табака, салата и рапса, экспрессирующих ген интерферона $\alpha 2b$ человека. Трансформацию ядерного генома растений проводили с помощью агробактерий, несущих генетические конструкции с целевым геном под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Наличие гена интерферона в полученных растениях было доказано методом ПЦР. Экстракты трансформированных растений табака, салата и рапса угнетали цитопатическое действие вируса везикулярного стоматита в фибробластах человека. Полученные растения могут быть использованы в ветеринарии для создания пищевых добавок, способствующих профилактике вирусных заболеваний животных.

Как известно, интерфероны — общее название, под которым в настоящее время объединяют ряд белков со сходными свойствами, вырабатываемых клетками организмов млекопитающих и птиц в ответ на вирусную инфекцию, благодаря чему эти клетки становятся более устойчивыми к вирусу. Интерфероны человека подразделяют на группы в зависимости от типа клеток, в которых они образуются: α , β и γ . α -интерфероны включают несколько видов белков с молекулярной массой около 20 кДа. Интерфероны используют для профилактики и лечения различных вирусных заболеваний, а также в комплексной противоопухолевой терапии [2]. Для производства рекомбинантных интерферонов используются различные системы, включая бактериальные [3] и дрожжевые [4] клетки. Растения как источник фармацевтически ценных белков имеют ряд важных преимуществ, а именно возможность получения рекомбинантных белков с необходимыми пост-трансляционными модификациями, незагрязненных бактериальными токсинами или патогенами животных и человека, такими как вирусы и прионы [5-7]. В некоторых случаях рекомбинантные белки растительного происхождения можно использовать без очистки в качестве съедобных вакцин, что значительно снижает их себестоимость [8]. Физиологически активные интерфероны человека были получены в растениях табака (интерферон β) [9], а также в других видах растений (интерферон $\alpha 2b$ и $\alpha 8$) [10-12] и суспензионных клеточных культурах риса (интерферон γ) [13]. Введение чужеродного гена в геном хлоропластов позволяет во многих случаях значительно повысить уровень его экспрессии. Транспластомные растения табака накапливали до 3 мг интерферона $\alpha 2b$ человека на г биомассы (20 % суммарного растворимого белка) [14]. Однако генетическая трансформация хлоропластов является сложной задачей, для многих хозяйственно-ценных видов растений она на сегодняшний день не решена. Альтернативным способом увеличения количества рекомбинантного белка может быть транзистентная (временная) экспрессия соответствующего гена в растениях [15]. Таким методом были получены физиологически активные интерфероны $\alpha 2b$ и β человека [16, 17] и интерферон α птиц [18]. Салат, накапливающий интерферон α кур, было предложено использовать как добавку в рацион домашней птицы для профилактики вирусных заболеваний [18]. К недостаткам транзистентной экспрессии следует отнести сложность проведения этого процесса в больших масштабах, в то время как стабильно трансформированные растения легко культивировать в больших масштабах. Основным недостатком растений со стабильно трансформированным ядерным геномом является низкий уровень экспрессии чужеродного гена, недостаточный для экономически выгодного процесса производства целевого белка [8]. Однако высокая удельная активность интерферона $\alpha 2b$ позволяет получать растения, демонстрирующие противовирусное действие, даже при стабильной

интеграции соответствующего гена в ядерный геном. Если за основу взят вид растений, пригодный для употребления в сыром виде, можно не проводить очистку целевого белка, используя растительную биомассу как добавку к рациону животных.

Целью представленной работы было создание растений модельных (табак) и сельскохозяйственных (салат, рапс) видов, которые несут и экспрессируют ген интерферона $\alpha 2b$ человека. Такие растения могут быть использованы в ветеринарии для создания пищевых добавок, способствующих профилактике вирусных заболеваний животных.

Материалы и методы. Для генетической трансформации растений использовали штамм GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*. Плазмидные векторные конструкции содержали целевой ген под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Вектор pCB073 включал нативный ген интерферона $\alpha 2b$ человека; вектор pCB125 содержал рекомбинантный ген интерферона, слитый с сигнальной последовательностью растительного гена кальретикулина (из *Nicotiana plumbaginifolia*). В качестве селективного использовался ген *bar*, определяющий устойчивость к фосфинотрицину, под контролем промотора гена нопалинсинтазы.

Генетическая трансформация табака (*Nicotiana tabacum*) сорта Wisconsin проводилась методом кокультивирования листовых дисков с суспензией агробактерий, несущих векторную конструкцию pCB073. Регенерацию растений осуществляли на среде MS [19], содержащей 1 мг/л бензиламинопурина, 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты и 5 мг/л фосфинотрицина.

Котиледоны и гипокотили семидневных проростков салата (*Lactuca sativa*) сорта «Одесский кучерявец» кокультивировали с суспензией агробактерий, несущих векторную конструкцию pCB125, и переносили на среду B5 [20], содержащую 25 г/л сахарозы, 3 мг/л кинетина, 0,5 мг/л нафтилуксусной кислоты и 5 мг/л фосфинотрицина. Побегов, устойчивых к фосфинотрицину, укореняли на среде B5, содержащей 0,5 мг/л нафтилуксусной кислоты и 5 мг/л фосфинотрицина. Полученные растения переносили в почву и опрыскивали гербицидом BASTA (действующее вещество фосфинотрицин). Семена, полученные путем самоопыления, проращивали в почве. Выращенные растения опрыскивали гербицидом BASTA.

Растения рапса различных сортов (Клеточный, Калиновский, Мария, Аира, ВНИС 100, Brutor, Westar) трансформировали методом кокультивирования листовых дисков с суспензией агробактерий, несущих векторную конструкцию pCB073 или pCB125, по методике, разработанной нами ранее [21]. Побегов регенерировали на среде, содержащей 10 мг/л фосфинотрицина.

Суммарную растительную ДНК выделяли с использованием СТАВ [22].

Для ПЦР-анализа использовали пару праймеров INTFOR 5'-ctcctgcttgaaggacag-3' и INTREV 5'-ggagtcctcttcatcag-3', с помощью которых амплифицировали участок гена интерферона длиной 264 п.н. Для детекции агробактериальной контаминации одновременно проводили амплификацию фрагмента гена *virD1* длиной 432 п.н. с помощью пары праймеров VirD1-1 5'-atgtcgcaaggcagtaagccca-3' и VirD1-2 5'-ggagtcttccagcatggagca-3'. Реакционная смесь общим объемом 10 мкл содержала 1 мкг растительной ДНК, каждый праймер в концентрации 0,25 мкМ, нуклеозидтрифосфаты в концентрации 0,5 мкМ, 0,5 ед. ДНК полимеразы *Taq* и соответствующий буфер (Helicon, Россия). Амплификацию проводили в следующих условиях: 94°C 5 мин → (94°C 30 сек, 60°C 30 сек, 72°C 30 сек) x 30 → 72°C 5 мин.

Экстракты из листьев готовили в двойном объеме буфера (100 мМ Tris/HCl, pH 8,0, 5 мМ Na₂EDTA, 100 мМ NaCl, 10 мМ меркаптоэтанол, 2,5 % поливинилпирролидон) или в однократном объеме 0,03 М HEPES. Содержание суммарного растворимого белка измеряли по методу Бредфорда [23]. Титрование интерферона проводили на основании его способности угнетать цитопатическое действие вируса везикулярного стоматита в фибробластах человека [24, 25]. Кроме того, анализировали биологическую активность интерферона с целью определения его антивирусного действия в системе *in vitro* – в перевиваемых культурах клеток ПТП, СПЕВ, ВНК-21, Vero, инфицированных вирусами животных: герпесвирусом коней первого типа, ротавирусом и энтеровирусами свиней. Анализ разницы титров инфекционной активности проводился по результатам титрования вирусов микрометодом предельных разведений.

Результаты. В нашей работе были использованы два варианта целевого гена. Нативный ген интерферона $\alpha 2b$ человека кодирует белок, содержащий N-концевой

сигнальный пептид, который обеспечивает секрецию белка во внеклеточное пространство и отщепляется при транслокации через мембрану эндоплазматического ретикулума. В рекомбинантном гене последовательность, кодирующая нативный сигнальный пептид, заменена на аналогичную последовательность из гена кальретикулина *Nicotiana plumbaginifolia*. Было показано, что использование рекомбинантного гена позволяет повысить уровень накопления интерферона при транзientной экспрессии в *N. benthamiana* [26].

Была проведена *Agrobacterium*-опосредованная генетическая трансформация эксплантов модельного (табак) и сельскохозяйственных (салат, рапс) видов растений. После селекции на питательных средах, содержащих фосфинотрицин, были отобраны 7 растений табака, 9 растений салата и 54 растения рапса. Присутствие гена интерферона, а также отсутствие агробактериальной контаминации были подтверждены с помощью дуплексного ПЦР-анализа для всех отобранных линий табака и салата и для 19 линий рапса (12 сорта Клеточный, 4 сорта Калиновский, 1 сорта Westar, 1 сорта Мария и 1 сорта Brutor).

С экстрактами растений салата, табака и рапса был проведен тест на способность угнетать цитопатическое действие вируса везикулярного стоматита в фибробластах человека. Наилучшие результаты были получены для растений салата. Из четырех проверенных растений три демонстрировали антивирусную активность, максимальное значение которой составляло 448 МЕ/г биомассы. Это сравнимо со значениями, приведенными в литературе для картофеля (560 МЕ/г биомассы [12]). Экстракты растений табака и рапса тоже обладали антивирусным действием, хотя значение активности интерферона в растениях этих видов было ниже.

Первичные трансформанты салата были высажены в грунт, семена были получены путем самоопыления и пророщены в теплице. Все полученные растения демонстрировали устойчивость к гербициду BASTA. Наличие в их клетках гена интерферона было подтверждено ПЦР-анализом. Были получены экстракты суммарных растворимых белков выращенных растений. В данный момент осуществляется их биологическое тестирование с использованием перевиваемых культур клеток животного происхождения (ПТП, СПЕВ, ВНК-21, Vero), а также вирусов животных трех семейств – Herpesviridae, Reoviridae, Picornaviridae.

Выводы. Были получены растения табака, салата и рапса, несущие и экспрессирующие ген интерферона $\alpha 2b$ человека. Физиологическая активность интерферона была подтверждена по его способности угнетать цитопатическое действие вируса везикулярного стоматита в фибробластах человека. Можно рекомендовать провести дальнейшие исследования с целью создания на основе полученных растений пищевых добавок, способствующих профилактике вирусных заболеваний животных.

У статті описано отримання та аналіз рослин тютюну, салату та рапсу, які експресують ген інтерферону $\alpha 2b$ людини. Трансформацію ядерного геному рослин проводили за допомогою агробактерій, які несли генетичні конструкції з цільовим геном під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти. Наявність гена інтерферону в отриманих рослинах було доведено методом ПЛР. Екстракти трансформованих рослин тютюну, салату та рапсу пригнічували цитопатичну дію вірусу везикулярного стоматиту на фібробласти людини. Отримані рослини можуть бути використані у ветеринарії для створення харчових добавок, які спряють профілактиці вірусних захворювань тварин.

Список літератури

1. Goodbourn, S., Didcock, L., Randall, R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures // *J. Gen. Virology* – 2000. – Vol. 81. – P. 2341-2364.
2. Воронцова, А.Л., Кудрявец, Ю.И. Интерферон как важный элемент оптимизации лечения онкологических больных // *Онкология* – 2000. – Т. 2. – С. 16-20.
3. Srivastava, P., Bhattacharaya, P., Pandey, G., Mukherjee, K.J. Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in *Escherichia coli* // *Protein Expression and Purification* – 2005. – Vol. 41. – P. 313-322.
4. Ghosalkar, A., Sahai, V., Srivastava, A. Secretory expression of interferon-alpha 2b in recombinant *Pichia pastoris* using three different secretion signals // *Protein Expression and Purification* – 2008. – Vol. 60. – P. 103-109.
5. Larrick, J.W., Thomas, D.W. Producing proteins in transgenic plants and animals // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 12. – P. 411-418.
6. Klestova, Z. Impact of Biotechnology Produced Plants on Intensive Intensity of Animal Viruses // *European Conf.: The 2nd EPSO Conf. "Interaction in Plant Biology, cells, plant and communities"*. – 2004. – P.84. – Session "Interaction between organisms – Pathogens/Symbionts". – Ischia (Naples), Italy. – P. 178.
7. Klestova, Z. Farming today, farming tomorrow // *Plant Biotechnology*. – 2000. – Printed by EPBN and EU Commission. – P. 4.
8. Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants

// Trends in Plant Sci. – 2001. – Vol. 6. – P. 219-226. **9.** Edelbaum O., Stein D., et al. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants // *J Interferon Res.* – 1992. – Vol. 12. – P. 449-453. **10.** Sawahel, W.A. The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation // *Cell Mol Biol Lett.* – 2002. – Vol. 7. – P. 19-29. **11.** Masumura, T., Morita, S., et al. Production of biologically active human interferon- α in transgenic rice // *Plant Biotechnology* – 2006. – Vol. 23. – P. 91-97. **12.** Ohya K., Matsumura T., et al. Expression of two subtypes of human IFN- α in transgenic potato plants // *J Interferon Cytokine Res.* – 2001. – Vol. 21. – P. 595-602. **13.** Chen T.L., Lin Y.L., et al. Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures // *Transgenic Res.* – 2004. – Vol. 13. – P. 499-510. **14.** Arlen, P.A., Falconer, R., et al. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b // *Plant Biotechnol J.* – 2007. – Vol. 5. – P. 511-525. **15.** Sheludko, Y.V. Agrobacterium-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants // *Recent Patents on Biotechnology.* – 2008. – Vol. 2. – P. 198-208. **16.** Li, J., Chen, M., et al. Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce // *Scientia Horticulturae* – 2007. – Vol. 112. – P. 258-265. **17.** Шелудько, Ю. В., Сіндаровська, Я. Р., Герасименко І. М., Банникова М. О., Олевинська З.М., Співак М. Я., Кучук М. В. Agrobacterium-опосередкована транзійтна експресія: перспективний підхід для масштабної продукції рекомбінантних білків у рослинах // *Наука та інновації.* – Т. 2 (N6). – С. 65-76. **18.** Song, L., Zhao, D.G., et al. Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce // *J Zhejiang Univ Sci B* – 2008. – Vol. 9. – P.351-355. **19.** Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15 – P. 473-497. **20.** Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* – 1968. – Vol. 50. – P. 151-158. **21.** Гочева, Є.А., Сахно, Л.О., Кучук, М.В. Спосіб отримання трансформованих рослин ріпаку методом агробактеріальної трансформації // Патент України на корисну модель № 39205. – Публ. 10.02.2009, бюл. № 3. **22.** Querci, M., Jermini, M., Van den Eede, G. (ed.) Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms – User manual // Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. – 2006. – 229 p. **23.** Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254. **24.** Rubinstein, S., Famillett, i P.S., Pestka, S. Convenient assay for interferons // *Journal of Virology.* – 1981. – V. 37. – P. 755-758. **25.** Белоцкий, С.М., Співак, Н.Я. Интерфероны: биологические и клинические эффекты // К.: Фитосоцицентр, 2006. – 288 с. **26.** Gils, M., Kandzia, R., et al. High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system // *Plant Biotech. J.* – 2005. – Vol. 3. – P. 613-620.

PERSPECTIVES OF USE OF TRANSGENIC PLANTS PRODUCING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE HUMAN INTERFERON ALPHA2B IN VETERINARY MEDICINE

Sheludko Yu.V.¹, Gerasimenko I.M.¹, Shcherbak N.L.¹, Sahno L.A.¹, Lipovaya N.N.¹,
Sindarovskaya Ya. R.¹, Olevinskaya Z.M.², Klestova Z.S.³, Spivak N. Ya.², Kuchuk N.V.¹

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NASU, Kiev

² Institute of microbiology and virology of Zabolotnogo name of NASU, Kiev

³ Institute of Veterinary medicine of UAAS, Kiev

The article describes the obtaining of tobacco, lettuce, and rape plants expressing human interferon alpha2b gene. Agrobacterium-mediated transformation of plant nuclear genome has been carried out with genetic constructions harbouring the gene of interest under control of CaMV 35S promoter. The presence of the transgen in the selected plants has been proved by PCR analysis. The extracts of transformed tobacco, lettuce and rape plants were shown to reduce the cytopathic effect of the vesicular stomatitis virus on human fibroblast cells. The obtained plants can be used in veterinary medicine for development of food supplements stimulating the resistance of animals to viral diseases.

УДК 619.616.98.578.2'213.15:615.37.41

МЕХАНИЗМ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БЕТУЛИНА ПРИ ИРТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Шуляк А.Ф.¹, Щегловитова О.Н.², Величко Г.Н.¹

¹ Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко,
г. Москва, Россия

² НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва, Россия

Целью исследований являлось изучение действия бетулина при экспериментальном и спонтанном ИРТ. В опытах на 118 телятах различного возраста испытывали препарат «Бересты экстракт сухой» (БЭС), содержащий не менее 87% бетулина. Детекцию вирусов в биоматериале проводили в ПЦР и классическом культуральным методом,