

УДК 602.2:582.5/9

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА ЛЮДИНИ ПІД КОНТРОЛЕМ ТКАНИНОСПЕЦИФІЧНОГО ТА КОНСТИТУТИВНОГО ПРОМОТОРІВ У ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ТЮТЮНУ (*NICOTIANA TABACUM* L.)

Ю.С. ЛУЧАКІВСЬКА¹, О.М. МАЙСТРЕНКО¹, З.М. ОЛЕВИНСЬКА²,
О.М. КІЩЕНКО¹, М.Я. СПІВАК², М.В. КУЧУК¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 148

²Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 156
e-mail: yu.luchakivskaya@gmail.com

Трансгенні рослини Nicotiana tabacum L. сорту Winskonsin та Petite Havana отримано шляхом агробактеріальної трансформації з використанням штаму A4 Agrobacterium rhizogenes та штаму GV3101 Agrobacterium tumefaciens, що містили векторні конструкції pCB124 та pCB161, де ген інтерферону альфа-2b, злитий з рослинним кальцетрикуліновим апопластним сигналом, знаходився відповідно під контролем конститутивного 35S промотору ВМЦК та коренеспецифічного MII промотору цукрового буряка. Молекулярно-біологічний аналіз підтвердив присутність трансгенів для 92–95 % аналізованих трансформованих рослин. Екстракти листя регенованих рослин тютюну покоління T₀ та T₁ та культури «бородатих» коренів виявляли антивірусну активність, що свідчить про можливість формування рекомбінантного біологічно активного білка. Показано тканиноспецифічну активність MII промотору цукрового буряка у трансгенних рослинах тютюну та коренеспецифічну активність в індукованій культурі «бородатих» коренів, проте відмічено зниження насінневої продуктивності рослин, трансформованих із використанням pCB161 векторної конструкції (A. rhizogenes).

Ключові слова: Nicotiana tabacum L., агробактеріальна трансформація, інтерферон альфа-2b, антивірусна активність, тканиноспецифічний MII промотор.

Вступ. Рослинні системи вважають економічно вигіднішими та безпечнішими для експресії рекомбінантних фармацевтичних білків порівняно з системами на основі мікроорганізмів та культур тваринних клітин. Показано, що рослини можна використовувати як біореактор для продукування рекомбінантних білків сироватки крові людини [1], регуляторів росту [2], моноклональних антитіл [3, 4], інтерферонів [5] та ін. Одним із важливих завдань генетичної інженерії при проведенні генетичної трансформації рослин є вивчення особливостей введення та подальшої експресії чужорідних генів у рослинних клітинах, що визначається методом генетичної трансформації, видом рослини, вимогами до експресії введеного гена і, відповідно, дизайном генетичної конструкції, способом селекції рослин тощо. Більшість дослідів описують отримання рекомбінантних білків рослинного походження у трансгенних рослинах тютюну

[6–10], зважаючи на значний об'єм та швидкі темпи наростання біомаси, а також добре налагоджену систему трансформації та високий регенераційний потенціал цих рослин, що дозволяє застосувати їх як модельні об'єкти для генетичної інженерії рослин. Дана робота описує особливості експресії рекомбінантного гена інтерферону альфа у трансгенних рослинах тютюну під контролем конститутивного 35S промотору ВМЦК та коренеспецифічного *MII* промотору цукрового буряка.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. Для агробактеріальної трансформації використовували асептичні рослини тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) сорту Petite Havana та Wisconsin. Рослини культивували на живильному середовищі MS [11] за температури 28 °С, 16-годинного фотоперіоду.

Векторні конструкції та бактеріальні штами. Т-ДНК ділянка плазмиди рСВ124 [12] містила рекомбінантний ген інтерферону альфа-2b людини, злитого з рослинним (*Nicotiana plumbagenifolia* L.) кальретикуліновим апопластним сигналом під контролем конститутивного 35S промотору ВМЦК, та селективний ген неоміцинофосфотрансферази (*nptII*) під контролем *nos* промотору. Плазмідну векторну конструкцію рСВ161 (рис. 1) було створено в результаті вирізання 35S промотору ВМЦК (1338 п.н. – фрагмент *EcoRI-NcoI*) із Т-ДНК ділянки плазмиди рСВ124 і заміщення його на *MII* коренеспецифічний промотор цукрового буряка (1745 п.н) [13]. Обидві векторні конструкції було перенесено до нопалінового штаму GV3101 *A. tumefaciens* та агропінового А4 штаму *A. rhizogenes*, які у подальшому застосо-

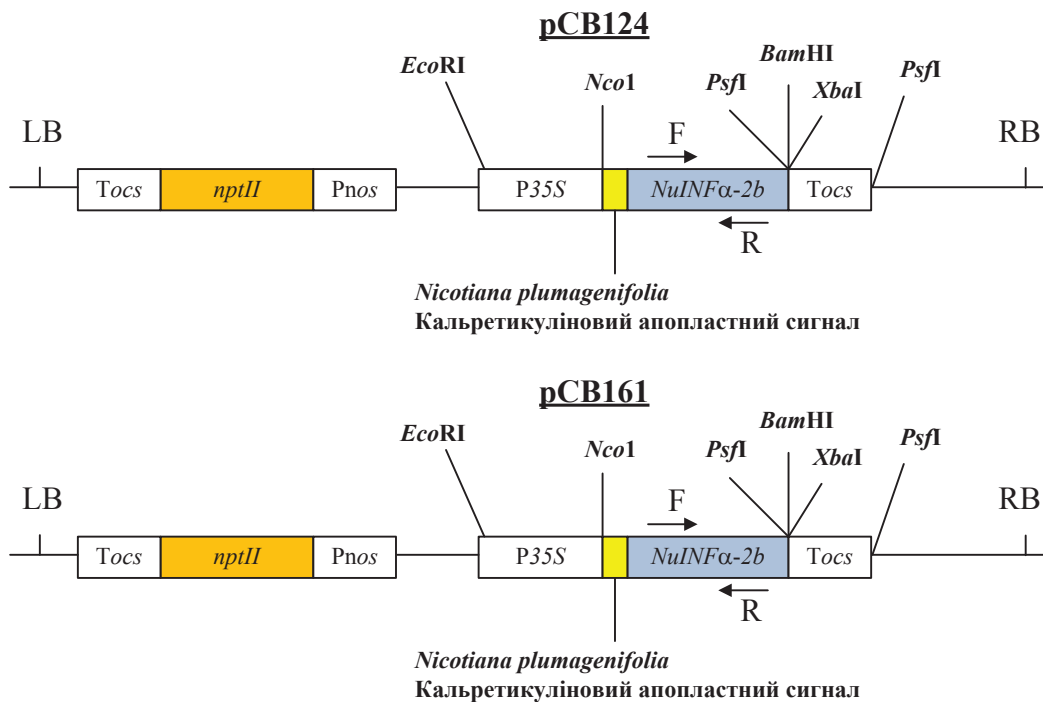


Рис. 1. Схеми векторних конструкцій рСВ161 та 124, що несуть ген інтерферону альфа-2b людини

ували для агробактеріальної трансформації.

Бактеріальні культури вирощували у рідкому середовищі Лурія-Бертані (пептон 10г/л, дріжджовий екстракт 5г/л, NaCl 10г/л, рН=7,2) з додаванням 50 мг/л карбеніциліну (для обох бактеріальних культур) та 50 мг/л рифампіцину, 25 мг/л гентаміцину (для *A. tumefaciens*) на орбітальному шейкері (200 об./хв) за температури 28 °C протягом 24 годин.

Генетична трансформація та селекція. Суспензійну бактеріальну культуру осаджували центрифугуванням (5000 об./хв, 4 °C). Отриманий осад ресуспедували у розчині макросолей за MS, 100 мг/л міоїнозиту, 20 г/л сахарози з додаванням 200 мкМ ацетосирингону та надалі культивували на ротаційному шейкері за температури 28 °C та 200 об./хв протягом години. Трансформацію тютюну проводили методом листових дисків. Нарізані листові пластинки інкубували у бактеріальній суспензії 10–15 хв та для трансформації викладали на безгормональне живильне середовище MS без додавання антибіотиків на 24 год.

Надалі експланти переносили на агаризоване живильне середовище MS із додаванням 100 мг/л канаміцинсульфату як селективного агента, 500 мг/л цефотаксиму для елімінації бактерій та 1 мг/л бензіламінопурину і 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти для ініціації прямої регенерації у випадку трансформації з використанням штаму GV3101 *A. tumefaciens*. Через 3–4 тижні регеновані рослини тютюну для укорінення переносили на безгормональне середовище MS із додаванням антибіотиків у вказаних концентраціях та культивували за температури 24 °C, 16-годинного фотоперіоду. Надалі отримані рослини переносили в умови ґрунту.

Після генетичної трансформації рослин тютюну з використанням A4 штаму *A. rhizogenes* експланти переносили на

безгормональне живильне середовище MS із додаванням 100 мг/л канаміцинсульфату як селективного агента та 500 мг/л цефотаксиму для елімінації бактерій. Після утворення через 3–4 тижні коренів, що характеризувалися Rі-фенотипом, культивування продовжували за температури 24 °C, 16-годинного фотоперіоду. Надалі рослини, отримані шляхом спонтанної регенерації, переносили в умови ґрунту.

Молекулярно-біологічний аналіз. Сумарну рослину ДНК екстрагували згідно Doyle J.L. та Doyle J.J. [14]. Тотальну бактеріальну ДНК екстрагували згідно Draper et. al. [15] Присутність трансгенів підтверджували за допомогою дуплексного ПЛР-аналізу з використанням праймерів 5'-ctctgcttgaaggacag-3', 5'-ggagtcctcctcatcag-3' для ідентифікації *HuINFa-2b* гена (розмір фрагмента 264 п.н.) та праймерів 5'-atgtcgcaaggcagtaagccca-3', 5'-ggagtccttcagcatggagcaa-3' для виявлення присутності *virD1* гена (розмір фрагмента 432 п.н.). Мультиплексну ампліфікацію фрагментів генів інтерферону людини *HuINFa-2b* та *virD1* для виявлення агробактеріального забруднення проводили за таких умов: денатурація 94 °C/5 хв; 30 циклів (денатурація 94 °C/30 с, відпал 60 °C/30 с, синтез 72 °C/35 с); заключний синтез 72 °C/5 хв. Продукти реакції фракціонували в 1 % агарозному гелі в трис-буферній системі.

Вимірювання антивірусної активності інтерферону. Екстракти рослин та корневих культур тютюну готували шляхом розтирання рослинних тканин у подвійному об'ємі буферу, що містить 100 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 5 мМ Na₂EDTA, 100 мМ NaCl, 10мМ меркаптоетанолу з додаванням 2,5 % полівінілпіролідону та наступного центрифугування (10000 об./хв протягом 5–7 хв, 4 °C; 15000 об./хв протягом 25 хв, 4 °C). Для вимірювання вмісту загального розчинного білка в отриманих

екстрактах використовували метод Бредфорда [16]. Активність інтерферону вимірювали методом мікротитрування [17] з незначними власними модифікаціями, що ґрунтується на здатності досліджуваних екстрактів захищати клітини клітинної культури перевиваних тестикул поросят (з колекції Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К.Заболотного НАН України) від цитопатичного ефекту вірусу везикулярного стоматиту (штам «Індіана» з колекції Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К.Заболотного НАН України). Активність рекомбінантного інтерферону виражали у міжнародних одиницях на грам сирої ваги листя рослин або зразків культури «бородатих» коренів (МО/г СВ) або на міліграм сумарного розчинного білка (МО/мг СРБ).

Статистична обробка. Статистичній обробці піддавали дані вимірювань антивірусної активності інтерферону. Аналітичні моделі, що демонстрували середнє значення з довірчими інтервалами за $p < 0,05$, вважали статистично значущими та в подальшому використовували для порівняльного аналізу. Для оцінки достовірності порівняння отриманих результатів використовували t-критерій Стюдента.

Результати та їх обговорення

Формування регенерованих рослин тютюну спостерігали через 3–4 тижні після *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації на середовищі MS з додаванням регуляторів росту для ініціації регенерації та антибіотиків у вказаних концентраціях, надалі рослини укорінювали на безгормональному живильному середовищі MS та культивували за температури 24 °С, в 16-годинному фотоперіоді. Через 3–4 тижні після *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації рослин тютюну спостерігали ініціацію коренетворення, що характеризувалося Рі-фенотипом: гормонезалежним ростом та відсутністю геотропізму. Контрольні нетрансформовані експланти не здатні були формувати регенеранти або ініціювати утворення «бородатих» коренів на середовищі з додаванням 100 мг/л канаміцинсульфату як селективного агента. Через 5–7 тижнів культивування спостерігали явище спонтанної регенерації в культурі «бородатих» коренів на середовищі без додавання фітогормонів (рис. 2), причому частота утворення Рі-коренів та формування спонтанних регенерантів (табл. 1) на культурі «бородатих» коренів у варіанті трансформації з використанням векторної конструкції рСВ161, де ген

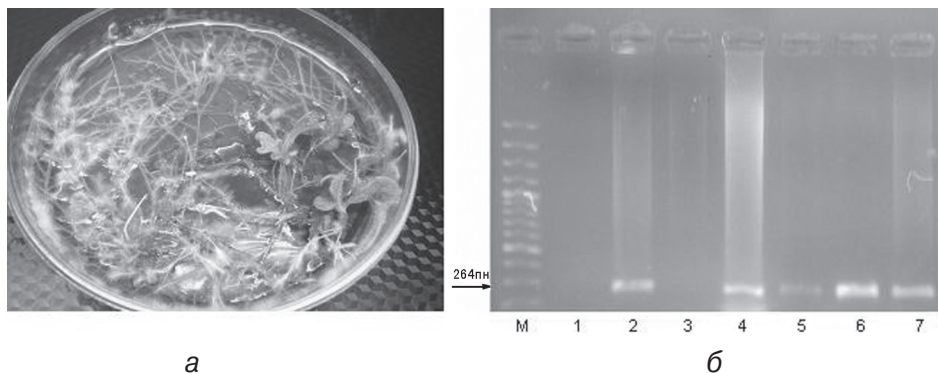


Рис. 2. Спонтанна регенерація рослин на культурі «бородатих» коренів на середовищі без додавання фітогормонів (а) та електрофореграма ПЛР-аналізу на присутність *HuINFα-2b* гена трансформованих рослин та зразків культури «бородатих» коренів тютюну *Nicotiana tabacum* L., (б) М – маркер (1 Kb Plus DNA Ladder, Fermentas), 1 – негативний контроль (проба без ДНК), 2 – позитивний контроль (плазмідна ДНК рСВ161), 3 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої рослини), 4-7 – ДНК досліджуваних рослин

Таблиця 1. Частота Ri-коренетворення та спонтанної регенерації на культурі «бородатих» коренів

Векторна конструкція	Кількість експлантів	Кількість точок утворення Ri-коренів	Кількість точок спонтанної регенерації на культурі Ri-коренів
pCB 124 (35S:: <i>HuINFα-2b</i>)	16	37	13
pCB 161 (<i>Mil</i> :: <i>HuINFα-2b</i>)	20	118	79

Таблиця 2. Активність білкових екстрактів листя рослин, трансформованих з використанням *A. tumefaciens*

Показник	МО/г СВ	МО/мкг СРБ
pCB 124 (35S::<i>HuINFα-2b</i>)		
Середнє значення	480 \pm 32.3	0,7 \pm 0.02
Варіабельність показника	121 – 960	0,23 – 1,14
pCB161 (<i>Mil</i>::<i>HuINFα-2b</i>)		
Середнє значення	45 \pm 0,7	0,043 \pm 0,0023
Варіабельність показника	0 – 150	0 – 0,19

Таблиця 3. Активність білкових екстрактів зразків культури «бородатих» коренів та листя регенованих з культури рослин при *A. rhizogenes*-опосередкованій трансформації

Показник	Ri-корені		Листя	
	МО/г СВ	МО/мкг СРБ	МО/г СВ	МО/мкг СРБ
pCB 124 (35S::<i>HuINFα-2b</i>)				
Середнє значення	267 \pm 13.2	0.46 \pm 0.012	690 \pm 47.41	0.81 \pm 0.07
Варіабельність показника	100 – 480	0.04 – 1.23	160 – 1000	0.17 - 1.23
pCB161 (<i>Mil</i>::<i>HuINFα-2b</i>)				
Середнє значення	392 \pm 27,4	0,53 \pm 0,09	283 \pm 15,1	0,14 \pm 0,02
Варіабельність показника	150 – 800	0,08 – 1,95	100 – 400	0,03 – 0,43

інтерферну знаходився під контролем коренеспецифічного *Mil* промотору, була значно вищою за частоту у варіанті з використанням конструкції pCB124, де ген інтерферону знаходився під контролем конститутивного 35S промотору.

Біологічну антивірусну активність визначали для білкових екстрактів листя регенованих рослин тютюну (по 6–8 зразків для кожної досліджуваної групи) та зразків культури «бородатих» коренів (по 5–6 зразків для кожної групи), отриманих в результаті генетичної трансформації з використанням штамів A4 *A. rhizogenes* та GV3101 *A. tumefaciens* та застосуванням векторних конструкцій pCB124 і pCB161, де ген інтерферону альфа–2b знаходився під контролем конститутивного 35S про-

мотору ВМЦК та коренеспецифічного *Mil* промотору цукрового буряка відповідно (табл. 2, 3).

Екстракти нетрансгенних (контрольних) рослин та зразків культури «бородатих» коренів, що не містили ген інтерферону людини, антивірусної активності не виявляли. Крім того, екстракти листя рослин, трансформованих із використанням конструкції pCB161 (*Mil*::*HuINF α -2b*) (GV3101 штам *A. tumefaciens*), активності практично не виявляли, що може бути непрямим доказом низької активності роботи коренеспецифічного промотору у надземних органах рослини. Антивірусна активність екстрактів листя була очікувано вищою для рослин тютюну, трансформованих із використанням обох агробактеріальних шта-

мів, де ген інтерферону знаходився під контролем конститутивного 35S промотору ВМЦК, ніж у варіанті з використанням коренеспецифічного *MII* промотору цукрового буряка. Біологічна противірусна активність екстрактів «бородатих» коренів була достовірно вищою для рослин, трансформованих із використанням векторних конструкцій, де ген інтерферону знаходився під контролем коренеспецифічного *MII* промотору цукрового буряка, і достовірно вищою за активність екстрактів листя регенованих рослин із досліджуваної культури Ri-коренів, можливо, через збереження коренеспецифічної активності *MII* промотору в культурі «бородатих» коренів. Показано підвищення показників антивірусної активності на сиру масу екстрактів листя трансформованих рослин при *A. rhizogenes*-опосередкованій трансформації з використанням обох векторних конструкцій, можливо, через вищий вміст білка у рослинах, регенованих з культури Ri-коренів [18].

Отримані результати свідчать про успішне введення рекомбінантних генів до геному рослин тютюну та можливість утворення біологічно активного білка, а також про те, що *MII* промотор цукрового буряка, ізольований та функціонально охарактеризований як коренеспецифічний промотор для цукрового буряка [19], виявляв коренеспецифічну активність при перенесенні до рослин тютюну та зберігав коренеспецифічність в індукованій культурі «бородатих» коренів.

Вкорінені рослини отримані при регенерації з культури «бородатих» коренів, та перенесені в умови ґрунту, характеризувалися нормальним фенотипом (рис.3). Для квітучих рослин, трансформованих з використанням рСВ161 векторної конструкції (*A. rhizogenes*), спостерігали зниження насінневої продуктивності, пов'язане зі стерильністю квіток внаслідок відсутності пилкових зерен у пиляках (у 5 з 17 перене-

сених в умови ґрунту рослин), а також з явищем гетеростилії у всіх культивованих рослин варіанта. Не спостерігали стерильності квіток рослин, отриманих в результаті будь-якого іншого варіанта трансформації.



Рис. 3. Рослини, отримані при регенерації з культури бородатих коренів та перенесені в умови ґрунту

В результаті штучного самозапилення було отримано життєздатне насіння. Проростки аналізували *in vitro* на стійкість до селективного антибіотика канаміцинсульфату. Розщеплення отриманих ліній покоління T_1 складало 3:1 за домінантною ознакою рекомбінантних генів. У відібраних ліній T_1 , що росли в присутності 100 мг/л канаміцинсульфату, ПЛР-аналіз показав присутність введених генів *nptII* та *HuINF α -2b*.

Аналіз на антивірусну активність екстрактів листя отриманих рослин покоління T_1 показав збереження тенденції до вищого рівня активності екстрактів листя рослин, трансформованих із використанням векторної конструкції, що містила цільовий ген під контролем 35S промотору ВМЦК (71–640 МО/мг СРБ), стосовно варіанта з використанням коренеспецифічного *MII* промотору (26–594 МО/мг СРБ). Варто зазначити, що антивірусну активність спостерігали для всіх рослин покоління T_1 ,

що свідчить про збереження здатності формування рекомбінантного білка конфігурації та активності, характерних для рослин T₀ покоління.

Висновки

Отримано трансгенні рослини *Nicotiana tabacum* L. сорту Winskonsin та Petite Havana шляхом ядерної агробактеріальної трансформації з використанням штаму A4 *A. rhizogenes* та штаму GV3101 *A. tumefaciens*, що містили векторні конструкції pCB124 та pCB161, де ген інтерферону альфа-2b, злитий з рослинним кальцетрикуліновим апопластним сигналом, знаходився відповідно під контролем конститутивного 35S промотору ВМЦК та коренеспецифічного *MilI* промотору цукрового буряка. Екстракти рослин покоління T₀ та T₁ виявляли антивірусну активність, що свідчить про можливість формування рекомбінантного біологічного активного білка. Показано коренеспецифічну активність *MilI* промотору цукрового буряка при перенесенні до рослин тютюну та збереження коренеспецифічності в індукованій культурі «бородатих» коренів, проте спостерігали зниження насінневої продуктивності рослин, що трансформовані з використанням pCB161 векторної конструкції (*A. rhizogenes*).

Перелік літератури

1. *Aliahmadi A., Rahmani N., Abdollahi M.* Plant-derived human vaccines: an overview // *Intl. J. Pharmacol.* – 2006. – Vol.2, №3. – P.268–279.
2. *Leite A., Kemper E.* Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants // *Mol. Breeding* – 2000. – №6. – С.47–53.
3. *Jain E., Kumar A.* Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters // *Biotechnology Advances.* – 2008. – № 26. – P.46–72.
4. *Daniell H., Streatfield S., Wycoff K.* Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // *Trends in plant science.* – 2001. – Vol.6, №5. – P.219–226.
5. *Edelbaum O., Stein D., Holland N. et al.* Expression of active human interferon-beta in transgenic

plants // *J. Interferon Res.* – 1992. – №12. – P.449–453.

6. *Karasev A.* Plant-produced Microbial Vaccines // *Current Topics in Microbiology and Immunology.* – Berlin Heidelberg: Springer-Verlag – 2009. – Vol.332 – 739 p.
7. *Barta A., Sommergruber K., Thompson D. et al.* The expression of a nopaline synthase human growth hormones chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue // *Plant. Mol. Biol.* – 1986. – №6. – P.347–357.
8. *Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K.* Production of antibodies in transgenic plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – № 89. – P.11745–11749.
9. *Mason H.S., Lam D.M.K., Arntzen C.J.* Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – №89. – P.11745–11749.
10. *Fischer R., Stoger E., Schillberg S. et al.* Plant-based production of biopharmaceuticals // *Curr. Opin. Plant. Biol.* – 2004. – №7. – P.152–158.
11. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays tissue cultures // *Physiol. Pl.* – 1962. – №15. – P.473–497.
12. *Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasimenko I., Olevinskaya Z., Simonenko Yu., Spivak M., Kuchuk M.* High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // *Plant Cell Reports* – 2010 – Vol.30, № 3 – P.407–415.
13. *Кищенко Е.М.* Особенности экспрессии репортерного гена β-глюкуронидазы под контролем 35S и *MilI* промоторов в трансгенных растениях // *Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр.* – 2010. – Т.9. – С.261–266.
14. *Doyle J.J., Doyle J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus.* – 1990. – №12. – P.13–15.
15. *Draper J., Scott R., Armitage Ph.* Plant genetic transformation and gene expression // *A laboratory manual.* Moscow: Mir, – 1991. – 780 p.
16. *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. – № 72. – P.248–254.
17. *Rubinstein S., Familletti Ph., Petska S.* Convenient assay for interferons // *J. Virol.* – 1981. – Vol. 37. – №5. – P.755–758.
18. *Sindarovska Y. R., Gerasymenko I. M., Sheludko Y. V. et al.* Transgenic plants regenerated from hairy roots of *Nicotiana benthamiana*: a promising host for transient expression of foreign proteins // *Cytol. Genetics.* – 2005. – Vol.39. – №6. – P.9–14.
19. *Oltmanns H., Kloos D.U., Briess W. et al.* Taproot promoters cause tissue specific gene expression within the storage root of sugar beet // *Planta.* – 2006. – № 224. – P.485–495.

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 10.11.2011

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ИНТЕРФЕРОНА
АЛЬФА ЧЕЛОВЕКА ПОД КОНТРОЛЕМ
ТКАНЕОСПЕЦИФИЧЕСКОГО
И КОНСТИТУТИВНОГО ПРОМОТОРОВ
В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА
(*NICOTIANA TABACUM* L.)

Ю.С. Лучакивская¹, А.Н. Майстренко¹,
З.М. Олевинская², Е.М. Кищенко¹,
Н.Я. Спивак², Н.В. Кучук¹

¹Институт клеточной биологии и генетической
инженерии НАН Украины

Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного, 148

²Институт микробиологии и вирусологии имени
Д.К.Заболотного НАН Украины

Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного, 156

e-mail: yu.luchakivskaya@gmail.com

Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сортов Winskonsin и Petite Havana получены в результате агробактериальной трансформации с использованием штамма А4 *Agrobacterium rhizogenes* и штамма GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*, которые несли векторные конструкции pCB124 и pCB161, где ген интерферона альфа–2b, слитый с растительным кальретикулиновым апопластным сигналом, находился соответственно под контролем конститутивного 35S промотора ВМЦК и корнеспецифического *Mll* промотора сахарной свеклы. Молекулярно-биологический анализ подтвердил присутствие трансгенов для 92–95 % анализированных трансформированных растений. Белковые экстракты листьев регенерировавших растений табака поколений T₀ и T₁ и культуры «бородатых» корней проявляли антивирусную активность, что свидетельствует о возможности формирования рекомбинантного биологически активного белка. Показано тканеспецифическую активность *Mll* промотора сахарной свеклы в растениях и корнеспецифическую активность в индуцированной культуре «бородатых» корней, отмечено снижение семенной продуктивности растений, трансформированных с использованием pCB161 векторной конструкции (*A. rhizogenes*).

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum* L., агробактериальная трансформация, интерферон

альфа–2b, антивирусная активность, тканеспецифический *Mll* промотор.

EXPRESSION OF HUMAN INTERFERON
ALPHA GENE DRIVEN BY CONSTITUTIVE
AND TISSUES SPECIFIC PROMOTERS
IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS
(*NICOTIANA TABACUM* L.)

Yu. S. Luchakivska¹, O. M. Maystrenko¹,
Z. M. Olevynska², O. M. Kishchenko¹,
M. Ya. Spivak², M. V. Kuchuk¹

¹ Institute of Cell Biology and Genetic
Engineering NAS of Ukraine

Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 148

² Danslo Zabolotny Institute of microbiology and
virology NAS of Ukraine

Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 156

e-mail: yu.luchakivskaya@gmail.com

Transgenic tobacco plants of Winskonsin and Petite Havana varieties were obtained via *Agrobacterium tumefaciens*- (GV3101) and *Agrobacterium rhizogenes* (A4)-mediated transformation using pCB124 and pCB161 vector constructs, where interferon alpha–2b gene fused with calreticulin apoplast targeting signal was driven by constitutive 35S CaMV promoter and *Mll* root-specific one of sugar beet respectively. PCR-analysis proved the presence of transgenes for 92–95 % analyzed plants. The protein leaf extracts of regenerated tobacco plants of T₀ and T₁ generation and those of hairy root culture demonstrated the antiviral activity that suggests the forming of recombinant biologically active protein. Tissue-specific activity of *Mll* sugar beet root-specific promoter was shown for transgenic tobacco plants as well as for induced hairy root culture though decreased seed productivity for plants generated via *Agrobacterium*-mediated transformation with pCB161 vector construction (*A. rhizogenes*) was registered.

Key words: *Nicotiana tabacum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, interferon alpha–2b, antiviral activity, tissue-specific *Mll* promoter.