

## ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН АРАХІСУ (*ARACHIS HYPOGAEA* L.) З ГЕНАМИ БІЛКІВ-СТИМУЛЯТОРІВ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ПРОТИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ *AG85*, *ESAT6*

Були отримані трансгенні рослини арахісу (*Arachis hypogaea* L.), які містять гени Ag85, ESAT6, що кодують білки-стимулятори імунної відповіді проти туберкульозу та маркерний ген *nptII*. Генетичну трансформацію проводили за допомогою штаму GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*, з використанням плазмиди pCB064. Інтеграція перенесених генів у рослинний геном доведена за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР-аналізу). Продукування білка з протитуберкульозною активністю виявили вестерн-блот гібридизацією.

Важливість представників родини бобових полягає в тому, що вони є надійним джерелом порівняно недорогого рослинного харчового білка. Арахіс (*Arachis hypogaea* L.) відноситься до зернобобових представників цієї родини, плоди якого можуть вживатися у їжу в необробленому вигляді. Рослини, що вживаються в їжу без термічної обробки, можуть використовуватись в якості так званих їстівних вакцин [1–3]. Наприклад, білок LTВ- ESAT6 синтезований в рослинах викликав антиген-специфічний ефект [4]. Вже існують повідомлення про успішний синтез туберкульозних антигенів в рослинах тютюну [5, 6] та арабідопсису [7]. Туберкульоз – небезпечна інфекційна хвороба, яка становить загрозу життю населення та спричиняє господарські втрати у тваринництві. Вакцина БЦЖ не дає повноцінного захисту для дорослих від туберкульозу легенів. Альтернативою може бути створення нових вакцин на основі генів Ag85, ESAT6 [6, 8–11]. У літературі висвітлені роботи по трансформації арахісу генами хітинази рису, який підвищує стій-

кість рослин до *Cercospora arachidicola* та маркерного гена *hpt* стійкості до гігromіцину [12]; геном *AtNHX*, надекспресія якого поліпшує соле-стійкість і підвищує посухостійкість в трансгенних рослинах арахісу [13]; генами фітосинтази з кукурудзи (*Zmpsy1*) та хітинази рису (*Rchit*) [14]; *cry1EC* геном, що надає стійкості до *Spodoptera litura* [15]; *spo-p* геном, що інгібує продукцію мікотоксину грибів у трансгенного арахісу [16]. У роботі [17] арахіс трансформували геном білка вірусу чуми великої рогатої худоби гемаглютиніну (H), з можливістю використання трансгенних рослин у якості їстівних вакцин. Метою нашої роботи було отримання трансгенних рослин арахісу з генами Ag85, ESAT6, що кодують білки-стимулятори імунної відповіді проти туберкульозу.

### Матеріали і методи

**Рослинний матеріал.** У роботі використовувались асептично вирощені в культурі *in vitro* рослини арахісу (*Arachis hypogaea* L.) – бактеріальні штами. Генетичну трансформацію проводили за допомогою штаму GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*, з використанням плазмиди pCB064 (рис. 1), яка містить гени Ag85, ESAT6, що кодують білки-стимулятори імунної відповіді проти туберкульозу та маркерний ген *nptII*.

**Генетична трансформація та селекція.** В даній роботі використовувався метод непрямой трансформації рослин арахісу з використанням *Agrobacterium tumefaciens* в якості переносника генів. В асептичних умовах гіпокотилі та стебла рослин нарізалися на експланти і переносилися

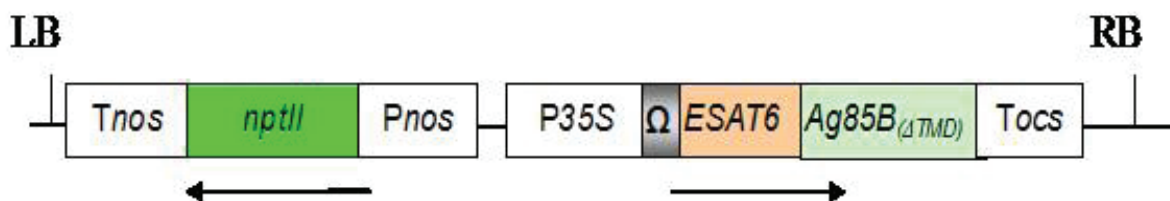


Рис. 1. Схематичне зображення плазмиди pCB064

на агаризоване середовище Гамборга В5, що містило регулятор росту *dicamba* у концентрації 1 мкг/л для ініціації калусогенезу. Через 1–2 тижні всі калуси переносили у рідке поживне середовище того ж складу для кокультивації з нічною культурою *Agrobacterium tumefaciens*. Кокультивацію проводили у темряві при температурі 22 °С протягом 24 годин. Проводили інфільтрацію, калус відмивали стерильною водою та переносили на агаризоване поживне середовище, що містило 750 мг/л цефатоксиму, для елімінації агробактерії та селективний агент 100 мг/л канаміцину. Через 4 тижні після селекції всі відібрані калусні клони переносили на регенераційне середовище, яке містило ВАР у концентрації 1 мкг/л,  $Ag_2S_2O_3$ , гідролізат казеїну у концентрації 300 мг/л, цефатоксим та канаміцин. Тіосульфат срібла чинить антиетиленову дію і таким чином підвищує регенераційну здатність калусів [18].

*Молекулярно-біологічний аналіз.* Для підтвердження трансгенної природи отриманих регенерантів, аналізували сумарну рослинну ДНК, екстраговану ЦТАБ-методом [19] за допомогою ПЛР із використанням відповідних праймерів: nptII 5'-CCTGAATGAACCTCCAGGACGAGGCA3', 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG3'; Ag85 5'-AGCAGTCCCTGACCAAGCTC-3', 5'-TCAGGTTGCTGCTACGAACG-3' ESAT6 5'-ATTTTCGCGGGTATCGAGGCCG-3', 5'-GGTCGAAGCCATTGCCTGACC-3'.

В реакції використовували 10 нг тотальної рослинної ДНК. Реакційна суміш загальним об'ємом 20 мкл містила 1 мкг рослинної ДНК, праймери в концентрації 0,25 мкМ, нуклеозидтрифосфати в конц. 0,5 мкМ, 0,1 од. ДНК полімерази Tag та буферний розчин. Ампліфікацію проводили при таких умовах: 94 °С 5 хв → (94 °С 30 с, 60 °С 30 с, 72 °С 30 с)×30 → 72 °С 5 хв. Після ампліфікації зразки фракціонували в 1 % агарозному гелі при напрузі електричного поля 100 В/см протягом 1 години у TBE-буфері. Гелі забарвлювали бромістим етидієм і фотографували, використовуючи червоний фільтр.

Для виявлення продукування білка з протитуберкульозною активністю проводили Вестерн-блот гібридизацію.

### Результати та обговорення

У ході проведеної роботи була визначена селективна концентрація канаміцину для калусних тканин введених у культуру *in vitro* рослин арахісу, яка склала 100 мг/л.

Генетичну трансформацію арахісу проводили за вищеописаною методикою, з використанням агробактерії, що містила плазмиду pCB164 як переносника генів Ag85, ESAT6. Селекцію проводили на агаризованому середовищі для калусоутворення з канаміцином у концентрації 100 мг/л. Після селекції всі відібрані калусні клони переносили на регенераційне середовище з тими ж селективними агентами. Через 2–3 місяці на частині відібраних калусів утворювались інтенсивно-зелені осередки регенерації, з яких при подальшому культивуванні утворювались пагони (рис. 2).



Рис. 2. Селекція та регенерація арахісу на селективному середовищі з канаміцином концентрації 100 мг/л

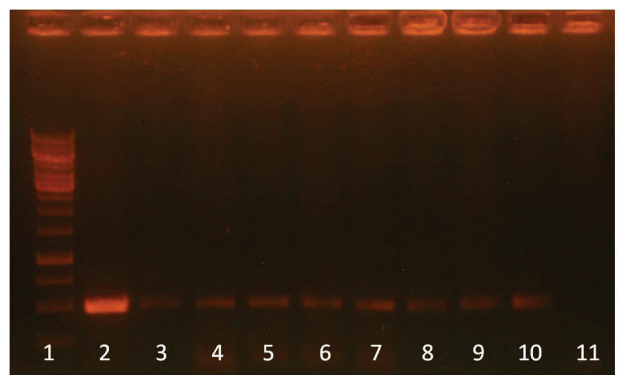


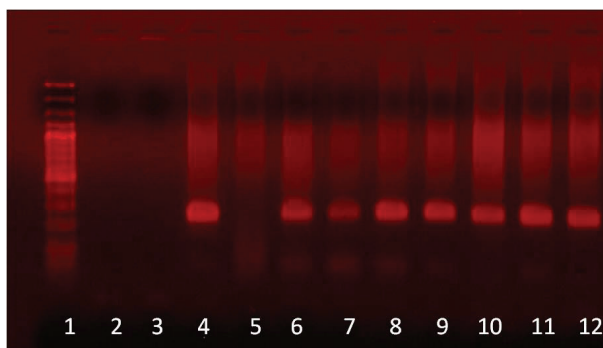
Рис. 3. ПЛР-аналіз на наявність гена Ag85 в рослинній ДНК трансгенних ліній арахісу: 1 – ДНК молекулярного маркера, 2 – ДНК плазмиди pCB064 (розмір ампліфікованого фрагмента 484 пн), 3–10 – ДНК трансгенних ліній, 11 – ДНК контрольної не-трансформованої лінії арахісу

Було відібрано 23 регенераційні лінії, які в подальшому аналізували на наявність перенесених генів за допомогою ПЛР-аналізу, з яких 8 ліній виявилися трансгенними і містили гени Ag85, ESAT6 та *nptII*. Результати ампліфікації фрагментів ДНК потрібного розміру 484 пн для гена Ag85, та 103 пн для ESAT6 представлені на малюнках (рис. 3, 4) відповідно.

Продуктування протеїну ESAT6-Ag85 (dTMD)-6His у біомасі трансгенної рослини арахісу лінії R15 виявлене методом Вестерн-блот гібридизації.

### Висновок

У результаті проведеної нами роботи вперше були отримані трансгенні рослини арахісу з генами Ag85, ESAT6, що кодують білки-стимулятори імунної відповіді проти туберкульозу, доведена їх трансгенна природа та виявлене продуктування рекомбінантного білка.



**Рис. 4.** ПЛР-аналіз на наявність гена білка ESAT6 в рослинній ДНК трансформованих ліній арахісу: 1 – ДНК молекулярного маркера, 2–3 – зразки без ДНК, 4 – ДНК плазмиди pCB064 (розмір ампліфікованого фрагмента 103 пн), 5 – ДНК контрольної нетрансформованої лінії арахісу, 6–12 – ДНК трансгенних ліній

### ЛІТЕРАТУРА

- Mason H.S., Warzecha H., Mor T., Arntzen C.J. Edible plant vaccines: application for prophylactic and therapeutic molecular medicine // *Trend Mol. Med.* – 2002. – 8, N 7. – P. 324–329.
- Walmsley A.M., Arntzen C.J. Plant delivery of edible vaccines// *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – 11 – P. 126–129.
- Tuboly T, Yu W., Baily A., Erickson L., Nagy E. Development of oral vaccine in plants against transmissible gastroenteritis virus of swine. – In: Toutant J.P., Balazs E. (eds) *Molecular farming*. La Grande Motte, Paris, 2000 – P. 239–248.
- Rigano M.M., Dreitz S., Kipnis A.P., Izzob A.A., Walmsley A.M. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine // *Vaccine.* – 2006. – 24, N 5. – P. 691–695.
- Zelada A., Calamante G., de la Paz Santangelo M., Bigi F., Verna F., Mentaberry A., Cataldi A. Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector // *Tuberculosis.* – 2006. – 86, N 3. – P. 263–267.
- Ilaria Pepponi, Gil R. Diogo, Elena Stylianou, Craig J. van Dolleweerd, Pascal M.W. Drake, Matthew J. Paul, Laura Sibley, Julian K.-C. Ma and Rajko Reljic Plant-derived recombinant immune complexes as self- adjuvanting TB immunogens for mucosal boosting of BCG // *Plant Biotechnology Journal.* – 2014. – P. 1–11
- Rigano M.M., Alvarez M.L., Pinkhasov J., Jin Y., Sala F., Arntzen C.J., Walmsley A.M. Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Rep.* – 2004. – 22, N 7. – P. 502–508.
- Brodin P., Rosenkrands I., Andersen P., Cole S.T., Brosh R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? // *Trend Microbiol.* – 2004. – 12, N 11. – P. 500–508
- Dietrich J., Weldingh K., Andersen P. Prospects for a novel vaccine against tuberculosis // *Veterinary Microbiol.* – 2006. – 112, N 2. – 4. – P. 163–169.
- Orme I.M. Current progress in tuberculosis vaccine development // *Vaccine.* – 2005. – 23, N 17/18. – P. 2105–2108.
- Orme I.M. Tuberculosis vaccines: Current progress // *Drugs.* – 2005. – 65, N 17. – P. 2437–2444.
- Iqbal M.M., Nazir F., Ali S., Asif M.A., Zafar Y., Iqbal J., Ali G.M. Over expression of rice chitinase gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) improves resistance against leaf spot // *Mol Biotechnol.* – 2012 – 50, N 2. – P. 129–136.
- Asif M.A., Zafar Y., Iqbal J., Iqbal M.M., Rashid U., Ali G.M., Arif A., Nazir F. Enhanced expression of AtNHX1, in transgenic groundnut (*Arachis hypogaea* L.) improves salt and drought tolerance // *Mol Biotechnol.* – 2011. – 49, N 3. – P. 250–256.
- Bhatnagar M., Prasad K., Bhatnagar-Mathur P., Narasu M.L., Waliyar F., Sharma K.K. An efficient method for the production of marker-free transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) // *Plant Cell Rep.* – 2010. – 29, N 5. – P. 495–502.
- Tiwari S., Mishra D.K., Singh A., Singh P.K., Tuli R. Expression of a synthetic cryIEC gene for resistance against *Spodoptera litura* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) // *Plant Cell Rep.* – 2008. – 27, N 6. – P. 1017–1025.
- Niu C., Akasaka-Kennedy Y., Faustinelli P., Joshi M., Rajasekara K., Yang H., Chu Y., Cary J., Ozias-Akins P. Antifungal Activity in Transgenic Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Conferred by a Nonheme Chloroperoxidase Gene. *Peanut Science.* – 2009. – 36, N 2. – P. 126–132.
- Abha Khandelwal, Vally K.J.M., Geetha N., Venkatachalam P., Shaila M.S., Lakshmi Sita G. Engineering hemagglutinin (H) protein of rinderpest virus into peanut (*Arachis hypogaea* L.) as a possible source of vaccine // *Plant Science.* – 2003. – 165, N 1. – P. 77–84.
- De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossele V., Movva N.R., Thompson C., Van Montagu M., Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme // *EMBO J.* – 1987. – 6. – P. 2513–2518.
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus.* – 1990. – 12. – P. 13–15.

**NIFANTOVA S.N., KOMARNICKIY I.K., SIMONENKO YU.V., KUCHUK N.V.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Sciences of Ukraine,  
Ukraine, 03143, Kyiv-143, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: sveta@iicb.kiev.ua*

**OBTAINING OF TRANSGENIC PEANUT (*ARACHIS HYPOGAEA* L.) PLANTS *AG85*, *ESAT6*  
GENES BY *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION**

**Aims.** The production of peanut cultivars with new properties is necessary. The purpose of this work was to develop a method of transgenesis *Ag85*, *ESAT6* genes in peanut genome by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Methods.** Transformation of peanut lines was carried out using cocultivation of peanut explants with *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 carrying genetic construct pCB064 containing *Ag85*, *ESAT6* genes and *nptII* gene. Selection was held on the solidified callus inducing medium with 100 mg/l kanamicyne. The selected callus clones were put on the regeneration medium. Obtained regeneration lines were analysed using PCR-analysis and Western-blot analysis. **Results.** 8 peanut regeneration lines had positive signals after PCR analysis with DNA fragments of required molecular size for *nptII* gene, *Ag85* and *ESAT6* genes. 1 regeneration line of peanut had positive signals after Western-blot analysis. **Conclusions.** Transgenic peanut plants containing *Ag85*, *ESAT6* genes were obtained. We have developed transgenic peanut plants expressing the *Ag85*, *ESAT6* proteins.

**Keywords:** peanut, *Ag85*, *ESAT6* genes, transformation.