

КІЩЕНКО О.М.[✉], **ПЕТЕРСОН А.А.**, **ВАСИЛЕНКО М.Ю.**, **КУЧУК М.В.**

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: kishchenko@gmail.com
[✉]kishchenko@gmail.com, (044) 526-71-04*

ТРАНЗІЄНТНА ЕКСПРЕСІЯ GFP У КУЛЬТУРІ РОСЛИННИХ ТКАНИН *IN VITRO* ЗА ВИКОРИСТАННЯ МОДУЛЬНОЇ СИСТЕМИ ВІРУСНИХ ВЕКТОРІВ

Транз'єнтна експресія генів, перенесених за допомогою *Agrobacterium*, широко застосовується в біотехнології рослин: 1) для дослідження функціонування генів та їх регуляторних послідовностей [1–3], 2) для оптимізації процесу генетичної трансформації [4, 5] та 3) для отримання рекомбінантних білків [6–9]. Найбільш ефективним методом для отримання рекомбінантних білків шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої транз'єнтної експресії є використання векторів на основі послідовності вірусів [6–9]. Завдяки таким вірусним векторам відбувається ампліфікація репліконів та розповсюдження їх від клітини до клітини рослини-господаря. Вихідна кількість заражених клітин збільшується і збільшується рослинна біомаса, що експресує та накопичує рекомбінантний білок. Репортерний білок GFP завдяки простоті детекції без додаткових субстратів та кофакторів є дуже зручним для візуалізації експресії чужинної перенесеної ДНК і найчастіше використовується під час розробки векторів та протоколів генетичної трансформації.

Серед рис, які зумовлюють привабливість рослинних систем у використанні для виробництва рекомбінантних білків, науковці називають можливість пост-трансляційних модифікацій білків, подібних до таких, що відбуваються в клітинах ссавців, та низьку собівартість вирощування рослин у теплицях. Проте вимогам GMP більшою мірою відповідають культури *in vitro* із більш контрольованими умовами вирощування та стандартизованим складом живильних середовищ. Тому метою нашого дослідження було оцінити можливість використання рослинних систем *in vitro* як продуцентів рекомбінантних білків, що транз'єнтно експресуються, на прикладі GFP за використання векторів на основі елементів геномів вірусів.

Матеріали і методи

Насіння *Nicotiana benthamiana* було надано Банком зародкової плазми рослин світової флори (ІКБГІ НАН, Україна). Насіння було поверхнево стерилізовано шляхом послідовної інкубації в 70 % етанолі (5 хв.) та розчині гіпохлориду натрію (50 % водний розчин препарату «Білізна», 15 хв). Після 5-кратного промивання стерильною водою та підсушування на фільтрувальному папері насіння пророщували на агаризованому середовищі MS/2, в якому була вдвічі зменшена концентрація макросолей та сахарози в порівнянні із живильним середовищем MS [10]. Асептичні рослини вирощували при +24°C та 16-годинному світловому періоді. Для регенерації пагонів по зрізах листових експлантів використовували середовище MSR: середовище MS/2 із додаванням 0,5 мг/л 6-бензиламінопурину та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти.

Для генетичної трансформації використовували агробактеріальний штам GV3101 *A. tumefaciens* та модульну систему векторів на основі вірусних послідовностей: pICH10881, pICH10570 та pICH7410 (див. [6]). Генетичні конструкції були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле/Halle/Saale, ФРН).

Агробактерії вирощували на ротаційному шейкері (200 об/хв) в середовищі LB [11] із додаванням антибіотиків: 50 мг/л ріфампіцину, 25 мг/л гентаміцину та 50 мг/л карбініциліну (pICH7410, pICH10570) або 50 мг/л канаміцину (pICH10881) протягом доби при 28°C, потім їх змішували, осаджували при 5500 об/хв при +22°C (5430R, Eppendorf), ресепендували в 1/6 об'єму бактеріальної суміші рідким середовищем MS/2 із додаванням 100 мкМ ацетосерингону та культивували ще 1 год на ротаційному шейкері при 100 об/хв та 22–24°C. До рослинних тканин, що знаходилися в рідкому середовищі MS/2 та були оброблені ультразвуком (UM-4, Unitra Unima Olsztyn,

Польща), додавали бактеріальну суспензію об'ємом, рівним об'єму MS/2, та проводили вакуум-інфільтрацію. Оброблений рослинний матеріал підсушували на фільтрувальному папері та культивували на агаризованому середовищі протягом доби, після чого відмивали автоклавованою водою та переносили на середовище MS/2 із додаванням 500 мг/л цефотаксиму.

Візуальний аналіз рослинних тканин на наявність флуоресценції GFP проводили, використовуючи як джерело УФ-світлодіодну лампу з максимумом випромінювання (395 ± 10) нм.

Екстракцію білкової фракції з рослинного матеріалу (приблизно 100 мг) здійснювали в 1 мл буфера, що містив 50 мМ Tris-base, 150 мМ NaCl, 5 мМ Na-EDTA, рН 8,0 при температурі $+4^\circ\text{C}$. Гомогенізацію здійснювали на лабораторному кульковому млині (M400, Retsch) за таких умов: 25 грм впродовж 2 хв. Після центрифугування при 12000g протягом 10 хв $+4^\circ\text{C}$ відбирали супернатант та використовували його для подальшого аналізу. Електрофоретичне розділення білкових екстрактів здійснювали у 12 % поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію. Електрофорез проводили в системі Mini-PROTEAN®Tetra Cell (BioRad, США). Після електрофорезу під контролем джерела УФ-світла з гелю вирізали смужку, що відповідала GFP, та проводили елюцію в буфері, який містив 50 мМ Tris-base, 1 % SDS та 0,5 мМ фенілметилсульфоніл флуориду (PMSF), рН 8.0 (Sigma).

Вимірювання інтенсивності флуоресценції екстрактів та елюатів здійснювали у кварцовій кюветі «Hellma Cuvette Fluorescence Semi Micro W» («Sigma», ФРН) з робочим об'ємом 3 мл на спектрофлуориметрі «Флуорат-02-Панорама» при збудженні флуоресценції – 395 нм, реєстрації флуоресценції – при 510 нм. Для побудування калібровочного графіка, який відповідає залежності інтенсивності флуоресценції від концентрації GFP (діапазон концентрацій 1–5 мкг/мл), в якості стандарту використовували хроматографічно очищений препарат GFP з концентрацією 1,44 мг/мл, визначеною мікрометодом із реактивом Бенедикта [12].

Результати та обговорення

Для генетичної трансформації векторами, що містять вірусні послідовності, використовували рослини *N. benthamiana*. *N. benthamiana* є найбільш поширеною рослиною-господарем для виробництва рекомбінантних білків шляхом транзйентної експресії *ex vitro* [6–9]. Протягом 3–4 тижнів на листових дисках асептичних рослин *N. benthamiana* при застосуванні гормонального живильного середовища MSR формувалася морфогенний калос, із якого регенерували пагони. Коли пагони досягали 0,5–0,8 см, проводили генетичну трансформацію, як описано в розділі «Матеріали та методи». Флуоресценцію GFP в рослинних тканинах можна було спостерігати з 3 доби після агроінфільтрації. Згодом площа рослинних тканин, які експресували GFP, збільшувалася і охоплювала весь експлант, що піддавався *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації. Екстракцію білкової фракції з рослинного матеріалу для вимірювання інтенсивності флуоресценції проводили на 16 добу після агроінфільтрації.

Кількісну оцінку вмісту GFP у розчинах здійснювали флуориметричним методом, використовуючи природну здатність білка давати максимум випромінювання при 509 нм за наявності відповідного джерела збудження 395 нм. При побудуванні калібровочного графіка, який відповідає залежності інтенсивності флуоресценції від концентрації GFP, було з'ясовано, що одні й ті самі концентрації стандарту GFP у водному розчині та в буфері для екстракції білків мають різну інтенсивність флуоресценції. Інтенсивність флуоресценції водних розчинів GFP була на 15 ± 5 % вищою, ніж відповідних розчинів GFP в буфері для екстракції.

Наступним кроком було дослідження розчинів GFP-стандарту в екстракті інтактної контрольної рослини *Nicotiana*. В результаті було виявлено явище «гасіння флуоресценції», коли відбувається значне послаблення флуоресценції, яка детектується приладом, внаслідок поглинання випромінювання компонентами екстракту (білки та низкомолекулярні сполуки вторинного метаболізму). Коефіцієнт гасіння флуоресценції не є сталою величиною, він залежить від багатьох факторів (тип рослинної тканини, вік рослини, спосіб вирощування, концентрація GFP). Крім того, було з'ясовано, що екстракти інтактної кон-

трольної рослини мають суттєву автофлюоресценцію, що також ускладнює визначення інтенсивності флюоресценції власне GFP в екстракті.

Неможливість коректного визначення кількості рекомбінантного білка GFP за інтенсивністю його флюоресценції внаслідок присутності перешкоджаючих компонентів у рослинних екстрактах призвела до пошуку інших підходів. Для усунення компонентів екстракту, які перешкоджають достовірному визначенню рівнів флюоресценції, нами був застосований метод електрофоретичного розділення. Електрофорез дозволяє розділити білкову фракцію рослинного екстракту, ідентифікувати цільовий білок та відокремити низькомолекулярні сполуки. Після електрофорезу рослинних екстрактів під контролем джерела УФ-світла 395 нм з гелю вирізали смужку, що відповідала білку GFP, проводили елюцію та вимірювали інтенсивність флюоресценції елюатів. Як контроль використовували: 1) розчин GFP-стандарту в буфері для елюції; 2) елюат розчину GFP-стандарту після електрофорезу та елюції. При порівнянні цих двох контролів було оцінено втрати білка за проведення електрофорезу та елюції на рівні 15–20 %.

Використовуючи розроблений метод, була визначена кількість GFP в рослинних тканинах, трансформованих векторами на основі вірусних репліконів [6]. Аналізували окремо пагони та калюсну тканину, що експресують GFP, в результаті аналізу було визначено, що пагони містили GFP у концентрації $242,0 \pm 0,7$ мкг/г сирової ваги, а калюсна тканина – $221,6 \pm 4,1$ мкг/г.

Рослини *N. benthamiana*, що вирощуються в ґрунті, при використанні *Agrobacterium-*

опосередкованої транзійтної експресії та MagnICON векторів можуть накопичувати рекомбінантний GFP у концентрації до 4300 мкг/г сирової ваги [6, 7]. Інші дослідники [8, 9] при застосуванні для транзійтної експресії вірусних векторів із послідовностями, що кодують РНК-залежну РНК полімеразу та транспортний білок вірусу мозаїки тютюну, оцінювали накопичення GFP на рівні 600–1200 мкг/г [9] або 2230 мкг/г [8] сирової ваги *N. benthamiana*. Такий рівень експресії в 10–25 разів вищий від транзійтної експресії, що зазвичай забезпечується потужним 35S промотором цвітної капусти [9]. Іншим прикладом застосування вірусних векторів є створення корневих ліній *in vitro*, які акумулюють приблизно 50–120 мкг GFP на г сирової ваги коренів *N. benthamiana* [13]. В нашій роботі рослинна система *in vitro* була здатна накопичувати рекомбінантний GFP в концентрації $242,0 \pm 0,7$ мкг/г сирової ваги. Розроблена методика показує перспективи для виробництва терапевтичних білків та антигенів у короткий термін (14–16 днів) шляхом транзійтної експресії рослинною системою *in vitro*.

Висновки

Розроблено методику *Agrobacterium-* опосередкованої транзійтної експресії рекомбінантних білків рослинною системою *in vitro* із використанням модульної системи векторів на основі елементів вірусних репліконів. Агроінфільтровані рослинні тканини *N. benthamiana* були здатні накопичувати рекомбінантний GFP в концентрації $242,0 \pm 0,7$ мкг/г сирової ваги.

Література

1. Bhaskar P.B., Venkateshwaran V., Wu L., Ane' J.-M., Jiang J. *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and silencing: a rapid tool for functional gene assay in potato // PLoS ONE. – 2009. – V. 4, N 6. – e5812. doi: 10.1371/journal.pone.0005812.
2. Sawers R.J.H., Farmer P.R., Moffett P., Brutnell T.P. *In planta* transient expression as a system for genetic and biochemical analysis of chlorophyll biosynthesis // Plant Methods. – 2006. – V. 2:15. doi: 10.1186/1746-4811-2-15.
3. An S.H., Choi H.W., Hong J.K., Hwang B.K. Regulation and function of the pepper pectin methylesterase inhibitor (CaP-MEI1) gene promoter in defence and ethylene and methyl jasmonate signalling in plants // Planta. – 2009. – V. 230. – P. 1223–1237. doi: 10.1007/s00425-009-1021-4.
4. Кищенко Е.М., Кучук Н.В. Влияние экзогенных углеводов на эффективность генетической трансформации табака и сахарной свеклы с помощью *Agrobacterium tumefaciens* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2005. – Т. 37, № 2. – С. 160–166.
5. He Y., Jones H.D., Chen S., Chen X.M., Wang D.W., Li K.X., Wang D.S., Xia L.Q. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum cv. Stewart) with improved efficiency // J.Exp. Bot. – 2010. – V. 61, No. 6. – P. 1567–1581. doi: https://doi.org/10.1093/jxb/erq035.

6. Marillonnet S., Giritch A., Gils M., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. *In planta* engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2004. – V. 101. – P. 6852–6857. doi: 10.1073/pnas.0400149101.
7. Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants // Nat. Biotechnol. – 2005. – V. 23. – P. 718–723. doi: 10.1038/nbt1094.
8. Shamloul M., Trusa J., Mett, V., Yusibov V. Optimization and utilization of *Agrobacterium*-mediated transient protein production in *Nicotiana* // J. Vis. Exp. – 2014. –V. 86. – e51204. doi: 10.3791/51204.
9. Lindbo J.A. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection compatible Tobacco mosaic virus expression vectors // BMC Biotech. –2007. – V. 7:52. doi: 10.1186/1472-6750-7-52.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 545 с.
12. Біохімія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 227 – Фізична реабілітація / Укл.: О.М. Савченко, В.М. Челябієва, О.І. Сиза. – Чернігів: ЧНТУ, 2016. – 87 с.
13. Skarjinskaia M., Karl J., Araujo A., Ruby K., Rabindran S., Streatfield S.J., Yusibov V. Production of recombinant proteins in clonal root cultures using episomal expression vectors // Biotechnol. Bioeng. – 2008. – V. 100, No. 4. – P. 814–819. doi: 10.1002/bit.21802.

KISHCHENKO O.M., PETERSON A.A., VASYLENKO M.Y., KUCHUK M.V.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,

Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnogo str., 148, e-mail: kishchenko@gmail.com

TRANSIENT EXPRESSION OF GFP IN PLANT TISSUE CULTURE *IN VITRO* USING VIRAL-BASED MODULE SYSTEM

Aim. *Agrobacterium*-mediated transient expression using viral-based vectors is one of the most effective method for recombinant protein production in plant. Transient expression of GFP using viral-based module system was studied in plant tissue culture *in vitro*. **Methods.** Regenerated shoots and callus clones of *Nicotiana benthamiana* were agroinfiltrated with viral-based module system. Protein extracts from GFP-positive tissues were resolved by non reducing polyacrylamide gel electrophoresis. GFP from gel was eluted and GFP fluorescence was measured by fluorescence spectrometry with excitation filter at 395 nm and emission filter at 510 nm. **Results.** Regenerated shoots and callus clones lines accumulated GFP at 242.0±0.7 and 221.6±4.1 µg per g fresh tissue, respectively. The obtained level of transient expression is comparable with other plant production systems in early stage development. **Conclusions.** The developed technique shows promise for production of therapeutic proteins and antigens in the short term (14–16 days) by transient expression system in plant tissue culture *in vitro*.

Keywords: viral-based module system, transient expression, recombinant proteins, plant tissue culture, GFP.