

УДК: 602.6:582.5/.9

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ МОРКОВИ (*Daucus carota* L.), ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОТЕИНОВ *Mycobacterium tuberculosis*

Ю. С. Лучакивская
Е. М. Кищенко
М. Ю. Василенко
Ю. В. Симоненко
Н. В. Кучук

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

E-mail: Yu.luchakivskaya@gmail.com

Получено 26.07.2011

Последние исследования показали высокую иммуногенность секреторных протеинов *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B и ESAT6, поэтому было предложено использовать их в качестве компонентов новой противотуберкулезной вакцины вместо широко используемой ныне BCG. Поскольку растения считают более безопасной и экономически целесообразной системой экспрессии для получения рекомбинантных протеинов по сравнению с системами на основе микроорганизмов и культур животных клеток, активно разрабатывается концепция «съедобных вакцин» на основе продуцентов вакциногенных протеинов — трансгенных растений, плоды, листья и корнеплоды которых можно употреблять в пищу. В статье показана возможность получения растений моркови сортов Нантская, Каротель, Красный Великан, Амстердамская и Перфекция, способных экспрессировать гены секреторных протеинов *Mycobacterium tuberculosis*. Перенос генов происходил с помощью агробактериальной трансформации с использованием штаммов GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* и A4 *Agrobacterium rhizogenes*. Бинарные векторы содержали гены протеинов Ag85B, Ag85B(ΔTMD), ESAT6 и слитого протеина Ag85B(ΔTMD)-ESAT6 под контролем конститутивного 35S промотора ВМЦК и корнеспецифического *Mil* промотора сахарной свеклы. Молекулярно-биологический анализ позволил подтвердить присутствие и транскрипцию селективного гена *nptII* для всех анализируемых растений, а также генов *fbpB* и *esxA* для 92–95% из них. При этом частота и эффективность трансформации достоверно не зависела от сорта растений. Вестерн-блот-анализ подтвердил присутствие рекомбинантных протеинов для некоторых растительных линий.

Ключевые слова: морковь, рекомбинантный протеин, секреторные протеины, *Mycobacterium tuberculosis*, агробактериальная трансформация.

Согласно информации Министерства здравоохранения Украины [1] по количеству случаев заболевания туберкулезом наша страна занимает второе после России место в Европе. Единственной доступной на сегодняшний день противотуберкулезной вакциной является *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG). Несмотря на то, что эта вакцина предусматривает достаточно высокий уровень иммунного ответа у животных, эффективность ее влияния на организм человека колеблется от практически полной защиты от инфекции до отсутствия иммунного ответа как такового [2]. При попытках создания более безопасной и эффективной

вакцины были изучены иммунопротекторные особенности очищенных внеклеточных протеинов *Mycobacterium tuberculosis* [2, 3] и предложено несколько перспективных видов вакцин, включая субъединичные, ДНК-вакцины, рекомбинантные производные BCG-вакцины и генетически модифицированные производные *M. tuberculosis* [4–9]. Первой субъединичной противотуберкулезной вакциной, которая прошла клинические испытания на животных, стала вакцина 72f, выделенная из *M. tuberculosis* [5]. Другими перспективными рекомбинантными протеинами являются иммунодоминантные, выделенные из *M. tuberculosis*, — комплексный

антиген 85 (группа родственных протеинов А, В и С) [3, 12, 13], МРТ64 [15] и ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target, 6kDa), который является доминантным целевым протеином для клеточно-опосредованного иммунитета на ранней стадии туберкулеза [2, 13, 14]. Принимая во внимание то, что первичным объектом, который поражается инфильтантом *M. tuberculosis*, являются дыхательные пути, мукозальное вакцинирование имеет значительное преимущество в индуцировании защитного иммунного ответа [16]. В связи с этим разрабатывается концепция «съедобных вакцин» на основе продуцентов вакциногенных протеинов — трансгенных растений, плоды, листья и корнеплоды которых можно употреблять в пищу [17, 18]. В таком случае антигены защищаются растительными клеточными стенками, что обеспечивает их более высокую стабильность к протеолитической деградациии при прохождении через желудочно-кишечный тракт [19] и доставку к клеткам слизистой оболочки кишечника, отвечающей за мукозальную систему иммунитета [20]. Растения считают более безопасной и экономически целесообразной системой экспрессии для получения рекомбинантных протеинов по сравнению с системами на основе микроорганизмов и культур клеток животных [21]. Способность экспрессированных в растительных тканях субъединичных вакцин индуцировать иммунный ответ при оральном введении человеку или животным была подтверждена экспериментально [10, 11, 16, 22–24]. В качестве растительного объекта для продуцирования компонентов субъединичных вакцин внимание привлекают растения моркови благодаря собственному высокому уровню содержания общего растворимого протеина. В настоящее время описано получение трансгенных растений моркови, способных к экспрессии таких фармакологических активных протеинов, как В-субъединицы термолабильного энтеротоксина *Escherichia coli* (LTB) [25], поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) [26], МНBS-антигена вируса гепатита В [27], интерлейкина 18 [28], гем-агглютинирина вируса кори [29], пептида цистицерка *Taenia solium* [30], МРТ64 протеина *Mycobacterium tuberculosis* [15], протеина диабет-ассоциированного аутоантигена [31], интерферона альфа-2b [32]. Данная работа показывает возможность трансформации растений моркови генами секреторных протеинов *M. tuberculosis* Ag85В и ESAT-6 при использовании различных экспрессионных и трансформационных систем.

Материалы и методы

Растительный материал

Для генетической трансформации использовали асептические проростки (гипокотили и семядольные листья) моркови разных сортов. Семена стерилизовали согласно общепринятой методике с использованием 40%-го раствора белизны (2%-го гипохлорита натрия) и проращивали на среде MS [33] при температуре 28 °С в темноте в течение 14–18 дней.

Векторные конструкции и бактериальные штаммы

Перенос генов происходил с помощью агробактериальной трансформации с использованием штамма GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*, содержавшего плазмиды pCB061, pCB062, pCB063 и pCB064 [34], которые несли гены протеинов Ag85В, Ag85В(ΔTMD), ESAT6, Ag85В(ΔTMD)-ESAT6 соответственно под контролем 35S-промотора ВМЦК (рис. 1). Все конструкции содержали также селективный ген неомицинфосфотрансферазы (*nptII*), вызывающий устойчивость к антибиотику канамицинсульфату. Кроме того, использовали векторную конструкцию pCB158 с последовательностью *esxA::fbpB*^{ΔTMD} (протеин Ag85В(ΔTMD)-ESAT6) под корнеспецифическим *MuI*-промотором [35]. При конструировании этого вектора (рис. 2) за основу был взят бинарный вектор pCB064. Фрагмент *EcoRI-NcoI* бинарного вектора pCB064, который содержит промотор 35S (1338 п.н.), был замещен последовательностью промотора *MuI* (*EcoRI-NcoI* размером 1735 п.н.) Все манипуляции с ДНК проводили согласно [36] и рекомендациям производителя эндонуклеаз рестрикции, лигазы и Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, Литва). Плазмидная ДНК бинарного вектора pCB158 была перенесена в штаммы A4 *A. rhizogenes* и GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*, которые в дальнейшем использовали для генетической трансформации растений.

Бактериальную культуру выращивали в жидкой среде LB (пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л, pH = 7,2) с добавлением 50 мг/л карбенициллина (для обеих бактериальных культур) и 50 мг/л рифампицина, 25 мг/л гентамицина (для *A. tumefaciens*) на шейкере при температуре 28 °С и 200 об/мин в течение 24 ч.

Генетическая трансформация и селекция

Суспензионную бактериальную культуру осаждали центрифугированием (5 000 об/мин, 4 °С), ресуспендировали полученный осадок в жидкой среде MS с добавлением 200 мкМ ацетосирингона и далее культивировали на ротационном шейкере при температуре 28 °С и 200 об/мин в течение часа.

Растительные экспланты инкубировали в бактериальной суспензии 10–15 мин, промывали стерильной дистиллированной водой. Трансформация проходила на стерильной фильтровальной бумаге в течение 2 сут на рассеянном свете.

В дальнейшем экспланты переносили на агаризованную питательную среду MS с добавлением 100 мг/л канамицина в качестве селективного агента, 500 мг/л цефотаксима для элиминации бактерий и 2 мг/л 2,4-D для инициации каллусообразования. Через 4–5 нед первичные каллусные клоны переносили на безгормональную среду MS для регенерации с добавлением антибиотиков в указанных концентрациях и культивировали при 24 °С, 16-часовом фотопериоде. Регенерировавшие побеги укореняли в жидкой среде MS и переносили в почву согласно описанной ранее методике [37].

Молекулярно-биологический анализ

Суммарную растительную ДНК экстрагировали СТАВ-методом [38]. Присутствие трансгенов подтверждали с помощью ПЦР-анализа с использованием праймеров 5'-tctacagcgactggtacagc-3', 5'-tcagggtgctgctacgaacg-3', специфических для гена *fbpB* (продукт амплификации 484 п.о.) 5'-ctgaccatggcagagcagcagtggaatttcgc-3', 5'-gagaattctgcgaacatcccagtgctcg-3' для гена *esxA* (продукт амплификации 299 п.о.) и 5'-cctgaatgaactccagcagagcagc-3', 5'-gctctagatccaggtcccgcctcagaag-3' для амплификации фрагмента *nptII* (622 п.о.). Для амплификации фрагмента гена *nptII* ПЦР проводили при следующих условиях: денатурация 94 °С/ 5 мин; 33 цикла (денатурация 94 °С/ 30 с, отжиг 56 °С/ 30 с, синтез 72 °С/ 35 с); заключительный синтез 72 °С/ 5 мин; для амплификации фрагмента гена *esxA*: денатурация 94 °С/ 3 мин; 30 циклов (денатурация 94 °С/ 30 с, отжиг 60 °С/ 30 с, синтез 72 °С/ 30 с); заключительный синтез 72 °С/ 5 мин; для амплификации фрагмента гена *fbpB*: денатурация 94 °С/ 5 мин; 30 циклов (денатурация 94 °С/ 30 с, отжиг 56 °С/ 30 с, синтез 72 °С/ 35 с), заключительный синтез 72 °С/ 5 мин. Продукты реакции фракционировали в 1%-м агарозном геле в трис-боратной буферной системе.

ОТ-ПЦР

Тотальную растительную РНК экстрагировали из листьев асептических растений согласно Logermann et al [39]. Синтез первой цепи кДНК на матрице РНК, предварительно обработанной ДНКазой I (Fermentas), осуществляли с использованием набора #K1612 (Fermentas) для проведения ОТ-ПЦР в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Для каждой пробы РНК проводили две параллельные реакции — в присутствии и в отсутствие (отрицательный контроль) обратной транскриптазы. Для последующего ПЦР-анализа использовали описанные выше праймеры и условия.

SDS-PAGE и вестерн-блот-анализ

Лиофилизированный растительный материал (листья моркови) растирали в трех объемах буфера Laemmli (62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 25% глицерола, 2% SDS, 0,01% бромфенола синего) с 10 мМ бета-меркаптоэтанолом. Экстракты смешивали с 2х буфером Laemmli в соотношении 1:1 и кипятили перед нанесением в гель. Полученные протеиновые экстракты разделяли с помощью SDS/PAGE в 12%-м полиакриламидном геле, окрашивая кумасси бриллиантовым голубым. Далее для проведения вестерн-блот-анализа протеины электрофоретически переносили на мембрану Hybond-P (GE, Healthcare) с использованием блоттингового буфера (25 мМ Tris, 192 мМ глицина, 20% (об/об) метанола, pH 8,3). Мембраны обрабатывали антиполигистидиновыми антителами с пероксидазой (Sigma). Связанные антитела детектировали с помощью реагента ECL (GE, Healthcare).

Результаты и обсуждение

Гипокотильные проростки растений моркови были получены на среде MS без добавления фитогормонов при 28 °С в темноте через 2–3 нед после поверхностной стерилизации семян. При выборе в качестве объекта генетической трансформации именно гипокотилей и семядольных листьев принимали во внимание высокую регенерационную способность ювенильных тканей и их повышенную чувствительность к агробактериальной трансформации [40]. Появление первичных каллусных клонов на среде MS с добавлением регулятора роста 2,4-D и 100 мг/л канамицина в качестве селективного агента было отмечено через 4–5 нед после обработки эксплантов бактериальной суспензией. Контрольные нетрансформированные экспланты

были неспособны к формированию каллусных клонов на среде MS при добавлении селективного антибиотика. Полученные каллусные клоны культивировали на безгормональной среде MS с добавлением селективных антибиотиков при 22–23 °С, 16-часовом фотопериоде. Первые регенеранты сформировались путем соматического эмбриогенеза через 3–4 мес. Удалось получить до 3–4 растений из одного каллусного клона, но их принимали за одно трансформационное событие, учитывая общее происхождение (рис. 1). Экспланты, обработанные штаммом *A. rhizogenes*, образывали каллусные клоны, а затем и регенеранты, минуя стадию Ri-корней. Ранее сообщалось о получении трансгенных «бородатых» корней моркови путем инокуляции листовых дисков *A. rhizogenes* [41], а также растений с нормальным фенотипом, регенерировавших из культуры Ri-корней [42]. Полученные нами трансгенные растения также имели нормальный фенотип; «бородатые» корни без добавления регулятора роста 2,4-D демонстрировали спонтанную регенерацию растений моркови практически во всех случаях. Частота регенерации растений из первичных каллусных клонов после трансформации достоверно не зависела от сорта. Контрольные нетрансформированные экспланты были неспособны к формированию каллусных клонов. Трансформированные растения моркови переместили в условия теплицы через 2–3 нед после укоренения.

Частота генетической трансформации моркови представлена в таблице как отношение количества полученных канамициностойчивых растений к общему количеству эксплантов, которые подвергали трансфор-

мации. Статистически достоверной разницы по этому показателю для разных сортов и растений, трансформированных с помощью различных штаммов, не наблюдали.

Эффективность трансформации рассчитывали как отношение числа трансгенных растений к количеству полученных при трансформации канамициностойчивых растений-регенерантов, подвергнутых молекулярно-биологическому анализу. ПЦР-анализ позволил подтвердить присутствие селективного гена, а также генов *fbpB* и *esxA* для 92–95% анализируемых растений (рис. 2).

С целью подтверждения транскрипции трансгенов выборочно анализировали 8 растений, которые несли слитый ген *fbpB::esxA* под контролем конститутивного и корнеспецифического промоторов. Для гена *nptII* показана транскрипция для всех растений, транскрипцию генов *fbpB* и *esxA* наблюдали у семи растений (рис. 3).

Вестерн-блот-анализ (рис. 4) подтвердил присутствие рекомбинантного протеина для некоторых растений. Учитывая невысокое содержание исследуемого протеина в тканях моркови, как полагают, из-за его токсичности для растительных клеток, а также относительно невысокую специфичность поликлональных антигистидиновых антител в наших исследованиях, нет оснований утверждать, что все сигналы, за исключением ярко выраженных, когда присутствие искомого протеина безусловно, являются результатом экспрессии трансгена. Для подтверждения накопления рекомбинантного протеина в клетке считаем необходимым дальнейшее проведение исследований с использованием антител к антигенам Ag85B и ESAT6.

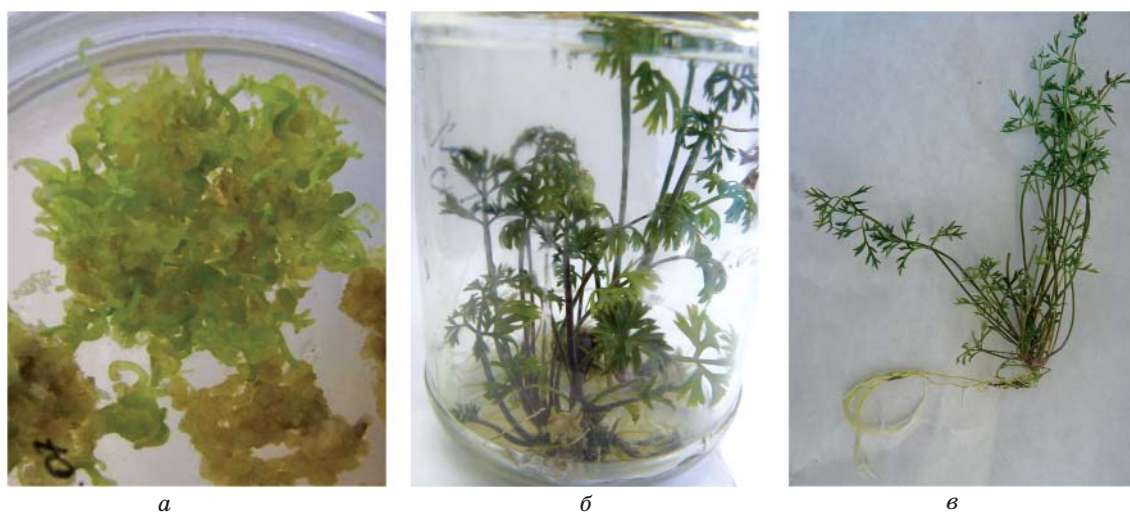


Рис. 1. Формирование первичных каллусных клонов на среде с добавлением селективного агента (а); регенерированные канамициностойчивые растения (б); укорененные растения моркови (в)

Частота генетической трансформации гипокотильных проростков моркови с использованием векторных конструкций рСВ061, рСВ062, рСВ063, рСВ064 и рСВ158

Сорт	Количество экплантов	Количество ка- намицистой- чивых растений	Частота транс- формации, %	Количество экплантов	Количество ка- намицистой- чивых растений	Частота транс- формации, %	Количество экплантов	Количество ка- намицистой- чивых растений	Частота транс- формации, %
	рСВ 061 (штамм GV3101 <i>A. tumefaciens</i>)			рСВ 062 (штамм GV3101 <i>A. tumefaciens</i>)			рСВ 063 (штамм GV3101 <i>A. tumefaciens</i>)		
Амстердамская	115	20	17,4	158	35	22,2	–	–	–
Каротель	176	33	18,9	90	17	18,9	162	32	19,7
Красный великан	192	37	19	83	16	19,3	129	22	17,1
Перфекция	234	39	16,6	105	25	23,7	60	10	16,8
Нантская	174	11	16,8	230	44	19,1	292	76	24,1
	рСВ 064 (штамм GV3101 <i>A. tumefaciens</i>)			рСВ 064 (штамм А4 <i>A. rhizogenes</i>)					
Нантская	295	46	15,6	122	24	19,6			
Каротель	302	52	17,2	174	31	17,8			
Красный великан	242	44	18,2	99	21	21,2			
Перфекция	318	64	20,1	95	23	24,1			
	рСВ 158 (штамм GV3101 <i>A. tumefaciens</i>)			рСВ 158 (штамм А4 <i>A. rhizogenes</i>)					
Нантская	231	66	28,6	251	73	29,03			
Каротель	124	42	33,9	234	62	26,5			
Красный великан	187	46	24,5	211	47	22,3			
Перфекция	196	52	27,1	187	48	25,6			
Амстердамская	213	53	28,4	151	48	31,7			

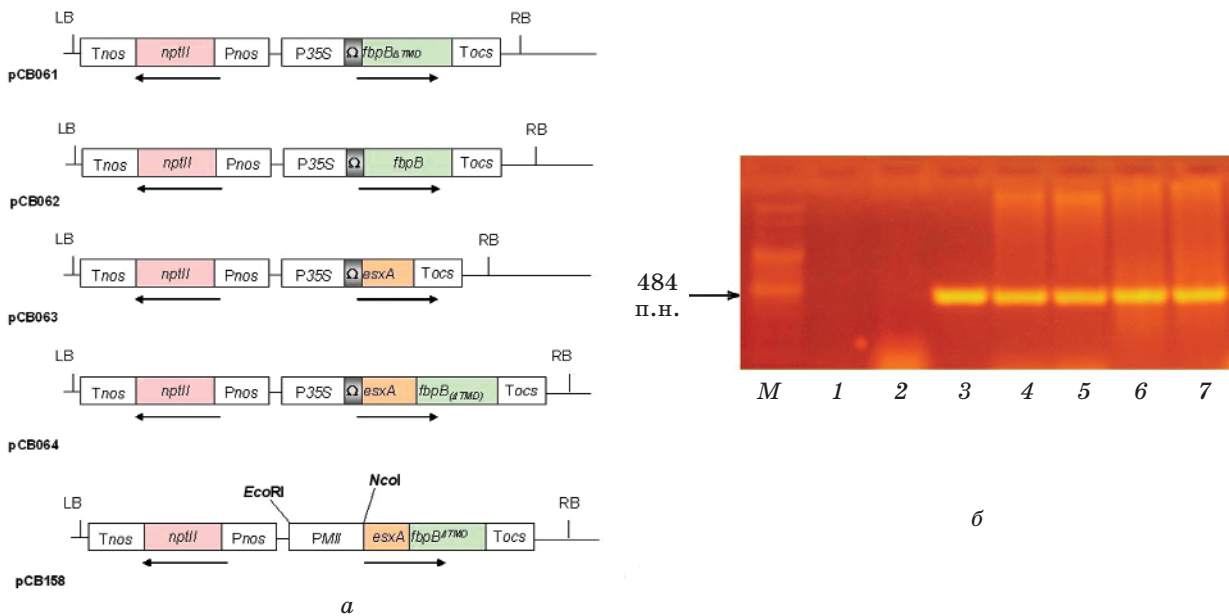


Рис. 2. Схемы векторных конструкций рСВ061, 062, 063, 064, 158, несущих гены секреторных протеинов *M. tuberculosis* (а); ПЦР-анализ трансформированных растений моркови на присутствие гена *fbpB* (б): М — маркер (1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas); 1 — отрицательный контроль (проба без ДНК); 2 — отрицательный контроль (ДНК нетрансформированного растения); 3 — положительный контроль (плазмидная ДНК — рСВ 064); 4–7 — ДНК анализируемых растений моркови

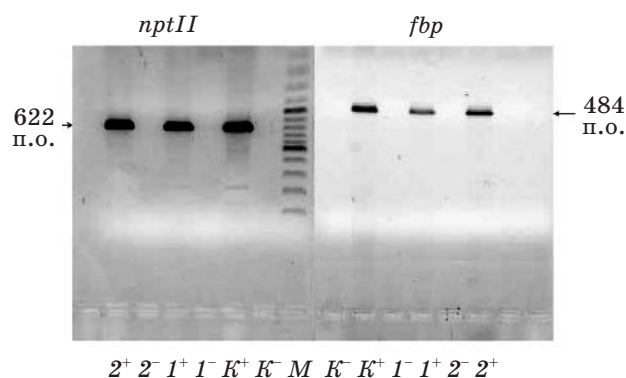


Рис. 3. ОТ-ПЦР трансформированных растений моркови для подтверждения транскрипции генов *nptII* и *fbpB*:

M — маркер (1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas); *K*⁺ — положительный контроль (плазмидная ДНК — pCB 064); *K*⁻ — отрицательный контроль (проба без ДНК); *1*⁺, *2*⁺ — кДНК анализируемых растений моркови (реакция в присутствии обратной транскриптазы); *1*⁻, *2*⁻ — отрицательный контроль для анализируемых растений моркови (реакция в отсутствие обратной транскриптазы)

В ряде работ описаны исследования, посвященные созданию трансгенных растений арабидопсиса [16, 20], сои [43], цикория [34], салата [44], табака [45], трансформированных с помощью векторных конструкций, которые несли ген вакциногенного протеина ESAT6. Уровень экспрессии этого антигена в растениях арабидопсиса составлял 11–25 мкг/г сырой массы [20], а в растениях табака — 0,5–1% суммарного растворимого протеина [45]. Показано также получение транспластомных растений табака, несущих гены *M. tuberculosis fbpB* и *esxA*. [46]. Высокий уровень накопления антигена Ag85b — до 800мг/кг сырой массы наблюдали при его транзientной экспрессии в растениях табака *Nicotiana bentamiana* L. [47]. Наши исследования показывают возможность получения трансгенных растений моркови, способных к экспрессии и аккумуляции секреторных протеинов *M. tuberculosis* Ag85B и ESAT-6 при использовании различных экспрессионных и трансформационных систем, и в дальнейшем будут направлены на изучение уровня накопления целевого протеина, его биологической активности и особенностей наследования приобретенного признака.

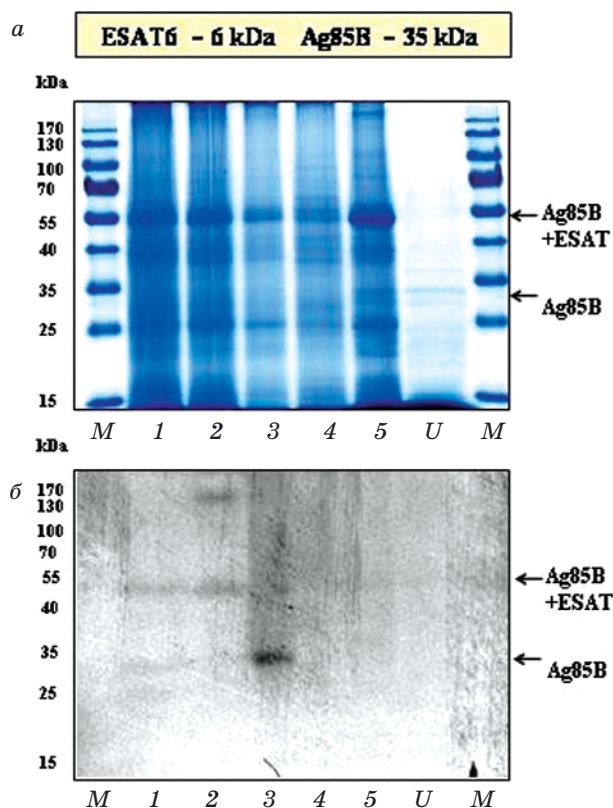


Рис. 4. SDS-PAGE (а) и вестерн-блот-анализ (б) протеиновых экстрактов трансгенных растений моркови для определения присутствия рекомбинантных протеинов Ag85B, ESAT6, Ag85B(ΔTMD)-ESAT6:

M — протеиновый маркер; *U* — протеиновый экстракт нетрансформированного растения; протеиновые экстракты растений моркови, трансформированных с помощью: *1, 2* — векторной конструкции pCB158; *3* — векторной конструкции pCB062; *4, 5* — векторной конструкции pCB063

Авторский коллектив выражает благодарность канд. биол. наук, заведующему лабораторией молекулярной генетики, старшему научному сотруднику Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины Б. В. Моргуну за помощь в проведении молекулярно-биологических исследований.

ЛІТЕРАТУРА

1. www.moz.gov.ua
2. Brandt L., Elhay M., Rosenkrands J. et al. Esat-6 subunit vaccination against mycobacterium tuberculosis // *Infect. Immun.* — 2000. — V. 68, N 2. — P. 791–795.
3. Sorensen A. L., Nagai S. Purification and Characterization of a Low-Molecular-Mass T-Cell Antigen Secreted by Mycobacterium tuberculosis // *Ibid.* — 1995. — V. 63, N 5. — P. 1710–1717.
4. Ohara N., Yamada T. Recombinant BCG vaccines // *Vaccine.* — 2001. — N 19. — P. 4089–4098.
5. Doherty T. M., Andersen P. Vaccines for Tuberculosis: Novel Concepts and Recent Progress // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2005. — V. 18, N 4. — P. 687–702.
6. Orme I. M. Tuberculosis Vaccines Current Progress // *Drugs.* — 2005. — V. 65, N 17. — P. 2437–2444.
7. Palendira U. Expanding the antigenic repertoire of the BCG improves protective efficacy against aerosol Mycobacterium tuberculosis infection // *Vaccine.* — 2005. — N 23. — P. 1680–1685.
8. Jiang Xiu-yun. Cloning and expression of mycobacterium bovis secreted protein MPB83 in *Escherichia coli* // *J. Biochem. Mol. Biol.* — 2006. — V. 39, N 1. — P. 22–25.
9. Gupta U. D., Katoch V. M., McMurray D. N. Current status of TB vaccines // *Vaccine.* — 2007. — N 25. — P. 3742–3775.
10. Streatfield S. J. Plant-based vaccines: unique advantages // *Ibid.* — 2001. — N 19. — P. 2742–2748.
11. Tacket C. O. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato // *Nat. Med.* — 1998. — V. 4 — P. 607–609.
12. Lakshmi R. Phagosomal processing of mycobacterium tuberculosis. Antigen 85B is modulated independently of mycobacterium viability and phagosome maturation // *Infect. Immun.* — 2005. — V. 73, N 2. — P. 1097–1105.
13. Derrick S. C., Yang A. L., Morris S. L. A polyvalent DNA vaccine expressing an ESAT6–Ag85B fusion protein protects mice against a primary infection with Mycobacterium tuberculosis and boosts BCG-induced protective immunity // *Vaccine.* — 2004. — N 23. — P. 780–788.
14. Wang B. L., Xu Y., Wu Ch. Q. Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis // *Prot. Expr. Purif.* — 2005. — V. 39 — P. 184–188.
15. Wang L. J. et al. The expression of Mycobacterium tuberculosis MPT64 protein in transgenic carrots // *Acta Bot. Sin.* — 2001. — N 43. — P. 132–137.
16. Rigano M. M., Dreitz S., Kipnis A. P. et al. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine // *Vaccine.* — 2006. — V. 24, N5. — P. 691–695.
17. Daniell H., Streatfield S. J., Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // *Trends Plant Sci.* — 2001. — V. 6, N 5. — P. 219–226.
18. Aliahmadi A., Rahmani N., Abdollahi M. Plant-derived human vaccines; an overview // *Intl. J. Pharmacol.* — 2006. — V. 2, N 3. — P. 268–279.
19. Lamphear B. J. et al. A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis in virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine // *Vaccine.* — 2004. — N 22. — P. 2420–2424.
20. Rigano M. M. et al. Production of a fusion protein consisting of the estrogenic *Escherichia coli* heat-labile toxin b subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell. Rep.* — 2004. — N 22. — P. 833–842.
21. Рукавцова Е. Б. и др. Трансгенные растения для фармакологии // *Вопр. биол. фарм. химии.* — 2006. — № 2. — С. 3–12.
22. Arakawa T. et al. A plant-based cholera toxin B-subunit insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes // *Nat. Biotechnol.* — 1998. — V. 16. — P. 934–938.
23. Wigdorovitz A. et al. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1 // *Virology.* — 1999. — V. 255. — P. 347–353.
24. Karasev A. Plant-produced Microbial Vaccines. Current Topics in Microbiology and Immunology. — Springer-Verlag Berlin Heidelberg. — 2009. — V. 332. — 120 p.
25. Rosales-Mendoza S., Soria-Guerra R. E. et al. Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin b subunit (LTB) in carrot (*Daucus carota L.*) // *Plant Cell. Rep.* — 2007. — V. 26. — P. 969–976.
26. Imani J., Berting A., Nitsche S. et al. The integration of a major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants // *Plant Cell. Tissue Org. Cult.* — 2002. — V. 71. — P. 157–164.
27. Deineko E. V., Zagorskaya A. A. et al. Analysis of hepatitis B virus M-antigene production of in transgenic carrot plant leaves // *Dokl AS 2009.* — 2009. — V. 42, N 3. — P. 400–403.

28. *Deineko E. V., Shmykova N. A., Tyukavin G. B. et al.* Creation of transgenic tobacco and carrot with human gene interleukin-18 // *Biotechnology in plant cultivation, animal husbandry and veterinary: Proc. of the 3rd Intern. Sci. Conf. M.* — 2004. — P. 130–131.
29. *Marquet-Blouin E., Bouche F. B., Steinmetz A., Muller C. P.* Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin // *Plant Mol. Biol.* — 2003. — V. 51. — P. 459–469.
30. *Sciutto E., Fragoso G., Manoutcharian K. et al.* New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis // *Arch. Med. Res.* — 2002. — V. 33. — P. 371–378.
31. *Porceddu A., Falorni A., Ferradini N. et al.* Transgenic plants expressing human glutamic acid decarboxylase (GAD 65) a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus // *Mol. Breeding.* — 1999. — V. 5, N 6. — P. 553–560.
32. *Luchakivskaya Y., Kishchenko O., Gerasymenko I. et al.* High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // *Plant Cell. Rep.* — 2011. — V. 30, N 3. — P. 407–415.
33. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays tissue cultures // *Physiol. Pl.* — 1962. — V. 15. — P. 473–497.
34. *Матвеева Н. А., Василенко М. Ю., Шаховский А. М., Кучук Н. В.* Агробактериальная трансформация салата (*Lactuca sativa* L.) конструкциями, несущими гены бактериальных из *Mycobacterium tuberculosis* // *Цитология и генетика.* — 2009. — Т. 43, № 2. — С. 27–32.
35. *Кищенко Е. М.* Особенности экспрессии репортерного гена β-глюкуронидазы под контролем *35S* и *MII* промоторов в трансгенных растениях // *Факторы экспериментальной эволюции организмов: Зб. наук. пр.* — 2010. — Т. 9. — С. 261–266.
36. *Маниатис Т., Фрич Е., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
37. *Лучакивская Ю.* Оптимизация протокола адаптации в почве растений моркови, регенерировавших *in vitro* // *Сб. тезисов XI конференции молодых ученых «Научные прикладные та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин та мікроорганізмів», 22–26 июня, 2010, Киев* — С. 106–107.
38. *Doyle J.J., Doyle J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus.* — 1990. — V. 12. — P. 13–15.
39. *Logemann J., Schell J., Willmitzer L.* Improved method for isolation of RNA from plant tissues // *Anal. Biochem.* — 1987. — V. 163. — P. 16–20.
40. *Thomas J. C., Guiltinan M. J., Bustos S. et al.* Carrot (*Daucus carota*) hypocotyl transformation using *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Cell. Rep.* — 1989. — V. 8. — P. 354–357.
41. *Capone I., Span L., Cardarelli M. et al.* Induction and growth-properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium-rhizogenes* T-DNA // *Plant Mol. Biol. Rep.* — 1989. — V. 13. — P. 43–52.
42. *Guivarc'h A. et al.* Localization of target cells and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency by direct acetosyringone pretreatment of carrot root discs // *Protoplasma.* — 1993. — V. 174. — P. 10–18.
43. *Нифантова С. Н., Комарицкий И. К., Кучук Н. В.* Получение трансгенных растений сои (*Glycine max*) с использованием *Agrobacterium tumefaciens* // *Сб. тезисов международной конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология», 8–12 сентября 2008 г., Звенигород.* — С. 280–281.
44. *Матвеева Н. А., Василенко М. Ю., Шаховский А. М. и др.* Эффективная агробактериальная трансформация растений цикория (*Cichorium intybus* L.) вектором с геном туберкулезного антигена ESAT-6 // *Цитология и генетика.* — 2011. — Т. 45, № 1. — С. 11–17.
45. *Zeladaa A. M., Calamanteb G. et al.* Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector // *Tuberculosis.* — 2006. — V. 86. — P. 263–267.
46. *Василенко М. Ю., Кучук М. М., Овчаренко О. О., Кучук М. В.* Отримання трансплазтомних рослин *Nicotiana benthamiana* із генами мікобактерії *Mycobacterium tuberculosis* // *Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр.* — 2010. — Т. 9. — С. 224–228.
47. *Dorokhov Yu., Sheveleva A. A., Frolova O.Y. et al.* Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves // *Tuberculosis.* — 2006. — V. 87, N3. — P. 218–224.

**ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ
РОСЛИН МОРКВИ (*Daucus carota* L.),
ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГЕНИ СЕКРЕТОРНИХ
ПРОТЕЇНІВ *Mycobacterium tuberculosis***

Ю. С. Лучаківська
О. М. Кищенко
М. Ю. Василенко
Ю. В. Симоненко
Н. В. Кучук

Інститут клітинної біології та генетичної
інженерії НАН України, Київ

E-mail: Yu.luchakivskaya@gmail.com

Останні дослідження показали високу імуногенність секреторних протеїнів *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B та ESAT6, тому було запропоновано використовувати їх як компоненти нової протитуберкульозної вакцини замість широко застосовуваної нині BCG. Оскільки рослини вважають більш безпечною й економічно доцільною системою експресії для отримання рекомбінантних протеїнів порівняно із системами на основі мікроорганізмів та культур тваринних клітин, активно розробляється концепція «істівних вакцин» на основі продуцентів вакциногенних протеїнів — трансгенних рослин, плоди, листя й коренеплоди яких можна вживати в їжу. У статті показано можливість отримання рослин моркви сортів Нантська, Каротель, Червоний велетень, Амстердамська та Перфекція, здатних експресувати гени секреторних протеїнів *Mycobacterium tuberculosis*. Перенесення генів відбувалося агробактеріальною трансформацією з використанням штамів GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* та A4 *Agrobacterium rhizogenes*. Бінарні вектори містили гени протеїнів Ag85B, Ag85B(Δ TMD), ESAT6 та злитого протеїну Ag85B(Δ TMD)-ESAT6 під контролем конститутивного 35S промотору ВМКК та коренеспецифічного *Mll* промотору цукрового буряку. Молекулярно-біологічний аналіз підтвердив присутність і транскрипцію селективного гена *nptII* для всіх аналізованих трансформованих рослин, а також цільових генів *fbpB* та *esxA* для 92–95% з них. Вестерн-блот-аналіз підтвердив присутність рекомбінантних протеїнів для деяких рослинних ліній.

Ключові слова: морква, рекомбінантний протеїн, секреторні протеїни, *Mycobacterium tuberculosis*, агробактеріальна трансформація.

**OBTAINING OF TRANSGENIC CARROT
(*Daucus carota* L.) PLANTS EXPRESSING
THE GENES OF SECRETORY
Mycobacterium tuberculosis PROTEINS**

Yu. S. Luchakivs'ka
O. M. Kishchenko
M. Yu. Vasylenko
Yu. V. Simonenko
N. V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic
Engineering of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kiyv

E-mail: Yu.luchakivskaya@gmail.com

Recent studies have shown high immunogenicity of secretory *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B and ESAT6 proteins. That's why it was suggested to use them as components of a new tuberculosis vaccine instead of the widely used BCG nowadays.

Production of recombinant proteins, especially vaccines, in transgenic plants has many economic and safety advantages as compared to animal and bacterial production systems, thus transgenic plants with raw-edible leaves, fruits and taproots could be discussed as so-called «edible vaccines». In this study we report the obtaining of carrot plants of Nantskaya, Karotel, Red Giant, Perfektziya and Amsterdamskaya varieties expressing the genes of secretory *Mycobacterium tuberculosis* proteins. The genes were transferred into plants via *Agrobacterium*-mediated transformation using *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 and *Agrobacterium rhizogenes* A4 strains. The binary vectors contained genes of Ag85B, Ag85B(Δ TMD), ESAT6 and fused Ag85B(Δ TMD)-ESAT6 proteins driven by constitutive 35S CaMV promoter and root-specific *Mll* sugar beet promoter. PCR and RT-PCR analysis proved the presence and transcription for *nptII* selective gene and *fbpB* and *esxA* genes for all the analyzed carrot plants in case of *nptII* and for 92–95% of them in case of target genes. Western-blot analysis proved presence of the recombinant proteins for several plant lines.

Key words: carrot, recombinant protein, secretory proteins, *Mycobacterium tuberculosis*, *Agrobacterium*-mediated transformation.