

УДК 577.29

Г.Д. Ильгекбаева, Е.Ш. Махашов, Г. Тулепова, Д. Есимханкызы, С.Т. Садиев

Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан.
E-mail: sadiev15@mail.ru**ЭКСПРЕССИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА *BRUCELLA ABORTUS* OMP16 В РАСТЕНИИ *NICOTIANA BENTHAMIANA***

Аннотация. Бруцеллез – одно из самых заразных и инфекционных заболеваний с высокими показателями заболеваемости крупного рогатого скота и человека в Казахстане. Использование современных биотехнологических методов для разработки надежных и доступных для фермеров вакцин является альтернативой для решения проблемы.

В качестве вектора для получения экспрессии антигенов возбудителя заболевания часто используют вирусы растений. Среди растительных вирусов широко используется вирус А винограда (ВАВ). При разработке вакцин или диагностических тестов против бруцеллеза, мембранные белки бруцеллы являются основными объектами исследований.

Мембранные белки (OMPs) являются специфическими поверхностными антигенами клетки, которые обладают иммуногенностью. OMPs являются идеальными кандидатами для производства рекомбинантных вакцин против бруцеллеза.

Объектом исследования являлся белок наружной мембраны (Omp16), который играет важную роль в подавлении выработки TNF- α в макрофагах. В данном исследовании было проведено молекулярное клонирование и анализ экспрессии гена Omp16, которая использована для экспрессии рекомбинантного белка в растениях. В качестве объектов исследований нами были выбраны бруцеллы из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 и растение *Nicotiana benthamiana*, который широко используется для производства целевого белка и является модельным растением для молекулярно-генетических исследований. Был сконструирован вирусный вектор для экспрессии бруцеллезного антигена Omp16 в растения *Nicotiana benthamiana*. Для регенерации трансгенных растений использовалось 19 эксплантов. В результате исследований внесенный ген Omp16 под контроль субгеномного промотора OPC4 успешно экспрессировался с сохранением эффективности экспрессии в трансгенных растениях. Эффективность вирусных векторов оценивалась на уровне транскрипции экспрессии мембранного белка Omp16 и вирусных белков. Инfiltrацию проводили всей листовой пластинки полностью, плотность агробактерий составила 0.7. Были получены трансгенные растения *Nicotiana benthamiana*, несущие ген капсидного белка ВАВ, была достигнута экспрессия мембранного антигена бруцеллы Omp16 в вирусном векторе путем замены OPC4 на ген Omp16. Разработка трансгенных растений была осуществлена с помощью агробактериальной трансформации.

Ключевые слова: *Brucella abortus* 19, мембранные белки, Omp16, экспрессия генов, рекомбинантные белки.

Введение. Бруцеллез – одно из самых заразных и инфекционных заболеваний с высокими показателями заболеваемости крупного рогатого скота и человека в Казахстане. Использование современных биотехнологических методов для разработки надежных и доступных для фермеров вакцин является альтернативой для решения проблемы. Поэтому в последние годы становятся популярными вакцины, разработанные на основе растений, благодаря многим преимуществам, которыми они обладают.

В зависимости от поставленной цели растения модифицируют для получения стабильной или временной экспрессии целевого белка. Хиагт с коллегами в 1989 году, работая над растительной вакциной, доказали, что использование растений для создания субъединичных вакцин является решением проблем, с которыми сталкиваются при производстве традиционных вакцин (1,2). Табак,

картофель, помидоры, кукуруза и рис являются растениями, которые на текущий момент используются в качестве природного «биореактора». Было произведено несколько вакцин на растительной основе, некоторые из которых в настоящее время проходят стадию клинических испытаний.

В качестве вектора для получения экспрессии антигенов возбудителя заболевания часто используют вирусы растений. Среди растительных вирусов широко используется вирус А винограда (ВAV). Отечественными учеными был разработан вирусный вектор на основе ВAV, где гетерологичные гены находились под контролем субгеномного промотора открытой рамки считывания 2 (ОРС2), хотя большая экспрессия была получена при встраивании гетерологичных генов под контроль субгеномного промотора ОРС4. К гетерологичным генам относятся ген усиленного флуоресцентного белка и ген капсидного белка вируса хлоротической пятнистости листьев яблони (3). При разработке вакцин или диагностических тестов против бруцеллеза мембранные белки бруцеллы являются основными объектами исследований.

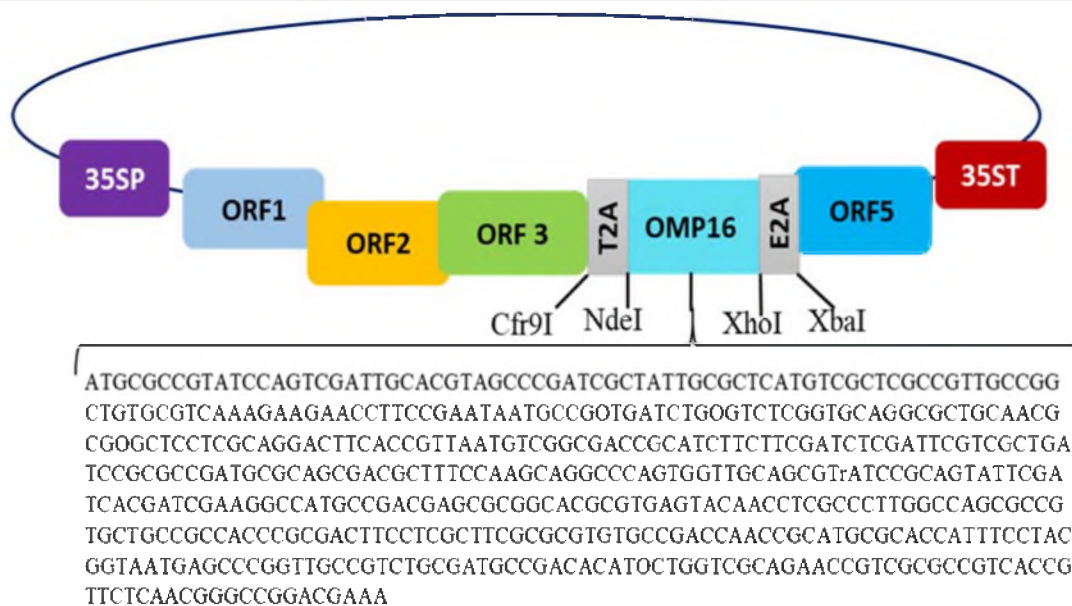
Мембранные белки (OMPs) являются специфическими поверхностными антигенами клетки, которые обладают иммуногенностью. OMPs являются идеальными кандидатами для производства рекомбинантных вакцин против бруцеллеза (4). OMP *Brucella abortus* S99 способствуют синтезу высоких уровней специфических молекул IgG против *Brucella* у кроликов при введении с липополисахаридом (LPS). С помощью моноклональных антител были обнаружены три основных и четыре малых белков наружной мембраны *Brucella abortus* и *Brucella melitensis* (5). Мембранный белок размером 16 кДа, названный Omp16, показывает значительное сходство с пептидогликан-ассоциированными липопотеидами (PAL) многих грамотрицательных бактерий (6). Двухвалентная слитая ДНК-вакцина, кодирующая белок *B. abortus* L7/L12 и белок Omp16, вызывала у мышей линии BALB *in vitro* Th1-доминантный иммунный ответ и значительный уровень защиты от заражения вирулентным штаммом *B. abortus* 544. В этом исследовании прокариотический вектор экспрессии, рЕТ-19b-Omp16, был индуцирован для экспрессии в *E. coli*. Экспрессию рекомбинантных белков можно быстро получить, используя прокариотические системы (7).

Объектом исследования являлся белок наружной мембраны (*Omp16*), который играет важную роль в подавлении выработки TNF- α в макрофагах. В данном исследовании было проведено молекулярное клонирование и анализ экспрессии гена *Omp16*, которая использована для экспрессии рекомбинантного белка в растениях. В качестве объектов исследований нами были выбраны бруцеллы из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19, и растение *Nicotiana benthamiana* который широко используется для производства гетерологичного белка и является модельным растением для молекулярно-генетической исследований.

Материалы и методы. Как сообщалось ранее, субклонирование этого гена проводили с использованием вектора рЕТ-19b, и для трансформации клеток был использован штамм TOP10F *Escherichia coli* (*E. coli*). Ген *Omp Omp16* размером 642 п.о. был амплифицирован методом ПЦР и успешно проклонирован. Результаты экспрессии были подтверждены с помощью секвенирования и анализа электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), который показал правильную полосу белка в 16.5 кДа (8). Клонирование, лигирование, подготовка компетентных клеток и трансформация проведены согласно общепринятым методам молекулярной биологии (9). Для подтверждения нуклеотидной последовательности мы просеквенировали полученный ген *Omp16* с помощью анализатора Ion S5 (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование продукта клонирования подтвердило целостность клонирования.

На следующем этапе ген *Omp16*, кодирующий поверхностный антиген *Brucella abortus* 19, был проклонирован в векторную плазмиду рGEM3zf+ для последующей сборки с промежуточными конструкциями, необходимыми для получения экспрессии целевого белка в растениях *Nicotiana benthamiana*. Вектор рCASSgva был любезно предоставлен Институтом биологии и биотехнологии растений МОН РК (10). Для клонирования и субклонирования в работе были использованы следующие плазмиды: рGEM3zf+ и рЕТ-19b. Агрофильтрацию растений осуществляли путем использования штамма *EHA105 Agrobacterium tumefaciens*.

Растения *Nicotiana benthamiana* были использованы для получения экспрессии бруцеллезного антигена *Omp16* с помощью разработанных вирусных векторов на основе вируса А винограда. Для проведения работ использовались стандартные реактивы и ферменты, предназначенные для генно-инженерных методов (9).



Стратегия конструирования вирусного вектора для экспрессии бруцеллезного антигена Omp16 в растениях *Nicotiana benthamiana*

При трансформации растений с использованием агробактерий семена растений *Nicotiana benthamiana* обрабатывались 10% раствором отбеливателя с добавлением 0,1 % Tween 20 в течение 20 мин. После промывания 10-15 семян располагали в боксы, содержащих твердую MSg₁ среду. Растения из семян выращивали в течение 3-4 недель при 28⁰С и 16- часовом световом периоде. Ежедневно проверялся уровень роста агробактерий. Культивирование эксплантов на среде с антибиотиками осуществлялось в течение 10-20 дней, далее экспланты снова пересаживались на свежую питательную среду и культивировались несколько недель, за это время происходило формирование каллуса. Побеги аккуратно отделялись от каллуса и нижних листков с помощью стерильного скальпеля. 4 побега располагали в один Magenta бокс. Корни начали формироваться через 3-4 недели культивирования. После формирования 3-5 корней длиной 2 см регенеранты готовили для пересадки в почву.

Растения, перенесенные в почву, накрывались пластиковыми колпаками с отверстиями для прохождения воздуха.

Вектор pSAMgva был использован для трансформации агробактерий методом замораживания/оттаивания. Отобранные колонии агробактерий проверялись на наличие конструкций методом ПЦР с соответствующими праймерами.

Анализ экспрессии капсидного белка ВАВ и Omp16 был осуществлен с помощью Вестерн блоттинга. Белки выделялись из тех же листьев, что и РНК. Белки были выделены методом, основанном на использовании мочевины. Кроме того, анализ экспрессии Omp16 в листьях осуществлялся с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии на микроскопе Leica TCS SP8 (Leica MICROSYSTEMS) и с помощью флуоресцентной микроскопии на микроскопе EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific). Статистическая обработка данных проводилась путем вычисления Байесовского фактора (minBF) в программе Matlab (11).

Обсуждение результатов. В результате исследований был разработан вектор на основе полного генома ВАВ путем внесения гена Omp16 под контроль субгеномного промотора OPC4. Стратегия разработки вектора изображена на рисунке. Гетерологичный ген располагался между OPC4 и OPC5 (12). Стоп-кодона капсидного белка ВАВ и целевого белка были удалены. Экспрессия мембранного белка происходила через 3'-терминальную субгеномную РНК, соответствующую капсидному белку ВАВ в немодифицированном геноме. Разделение мембранного белка и вирусных белков осуществлялось с помощью 2А пептидов, внесенных между капсидным белком ВАВ и мембранным белком. Модифицированная часть генома ВАВ была перенесена в вектор pSAMgva по сайтам AatII и Sall. Анализ на наличие рекомбинантных векторов проводили с помощью ПЦР, использовались праймеры, специфичные для КБ ВХПЛЯ и Omp16.

Эффективность вирусных векторов оценивалась на уровне транскрипции экспрессии мембранного белка Omp16 и вирусных белков. Инfiltrацию проводили полностью всей листовой пластинки, плотность агробактерий составила 0.7. Были получены трансгенные растения *Nicotiana benthamiana*, несущие ген капсидного белка ВАВ, и была достигнута экспрессия мембранного антигена бруцеллы Omp16 в вирусном векторе путем заменой ORC4 на ген Omp16. Разработка трансгенных растений была осуществлена с помощью агробактериальной трансформации. Для регенерации трансгенных растений использовалось 19 эксплантов. Побеги размером 1-2 см в длину пересаживали на среду для формирования корней. После появления 2-3 корней регенерантное растение переносили в почву для адаптации и получения семян. Анализ экспрессии мембранного белка осуществлялся с помощью иммуноблоттинга с использованием первичных антител к целевому белку. Кроме того, экспрессия Omp16 в векторе анализировалась флуоресцентной конфокальной микроскопией на 4-ый день после агроинfiltrации.

В результате исследований внесенный ген Omp16 под контроль субгеномного промотора ORC4 успешно экспрессировался с сохранением эффективности экспрессии в трансгенных растениях. Вирусный вектор можно использовать для экспрессии других бруцеллезных мембранных антигенов, таких как Omp25 или Omp31 в трансгенных растениях, согласно отработанной нами протоколу.

Разработка векторов на основе геномов вирусов для экспрессии мембранных белков бруцеллы является актуальной в виду ряда причин. Во-первых, появилась возможность наработки большого количества бруцеллезных антигенов, необходимых для разработки вакцин и диагностических препаратов. Причем эти антигены, полученные на основе растений, свободные от патогенов животных, обладают дешевой культивирования растений и возможностью быстрого масштабирования производства.

Г.Д. Илгекбаева, Е.Ш. Махашов, Г. Төлепова, Д. Есімханқызы, С.Т. Садиев

Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

**NICOTIANA BENTHAMIANA ЗАУЫТЫНДАҒЫ
БЕТТІК АНТИГЕНДІ BRUCELLA ABORTUS OMP16 БЛІМІ**

Аннотация. Бруцеллез – Қазақстандағы ірі қара мал мен адам жиі ауыратын жұқпалы және инфекциялық аурудың бірі. Фермерлерге сенімді және қолжетімді вакцина жасау үшін заманауи биотехнологиялық әдістерді қолдану аталған мәселені шешудің баламалы жолы болып саналады.

Өсімдік вирустары көбінесе қоздырғыш антиген экспрессиясын алу үшін вектор ретінде қолданылады. Өсімдік вирусының ішінде жүзім вирусы А (ВАВ) кеңінен пайдаланылады. Бруцеллезге қарсы вакцина немесе диагностикалық мәтін жасауда бруцелланың мембраналық ақуызы зерттеудің негізгі объектісі болып саналады.

Мембраналық ақуыздар (ОМР) – иммуногендік клеткаларға тән беттік антигендер. ОМР – рекомбинантты бруцеллез вакциналарын өндіруге өте қолайлы кандидаттар.

Зерттеу нысанына макрофагтағы TNF- α өндірісін басуда маңызды рөл атқаратын сыртқы мембраналық ақуыз (Omp16) алынды. Бұл зерттеуде молекулалық клондау және өсімдіктердегі рекомбинантты ақуызды экспрессиялау үшін пайдаланылған Omp16 ген экспрессиясына талдау жасалды. Зерттеу нысандары ретінде бруцелланы *Brucella abortus* 19 вакцина штамынан және мақсатты ақуызды өндіруге кеңінен қолданылатын, молекулалық-генетикалық зерттеулердің үлгілі өсімдігі – *Nicotiana benthamiana* өсімдігінен таңдалды. Никотиана бентамиана өсімдігінде бруцеллез Omp16 антигенін экспрессиялау үшін вирустық вектор құрылды. Трансгенді өсімдік регенерациясы үшін 19 эксплант қолданылды. Зерттеу нәтижесінде ORF4 субгеномдық промоторының бақылауы негізінде енгізілген Omp16 гені трансгенді өсімдіктегі экспрессия тиімділігін сақтау арқылы көрінді. Вирустық вектор тиімділігі Omp16 мембраналық протеин мен вирустық белок экспрессиясының транскрипциясы деңгейінде бағаланды. Барлық жапырақ тақтасы инfiltrацияланған, агробактериялардың тығыздығы 0.7. ВАВ капсидті ақуызының генін алып жүретін трансгенді өсімдіктер алынды, ал никотиана бентамиана және вирустық вектордағы бруцеллалардың Omp16 мембраналық антиген экспрессиясына ORF4-ті Omp16 генімен алмастыру арқылы қол жеткізілді. Трансгенді өсімдіктердің дамуы агробактериалды трансформацияны қолдану арқылы жүзеге асырылды.

Түйін сөздер: *Brucella abortus* 19, мембраналық ақуыздар, Omp16, гендік экспрессия, рекомбинантты белоктар.

G.D. Ilgekbaeva, E.Sh. Makhshov, G. Tulepova, D. Yessimkhankyzy, S.T. Sadiev

Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

**EXPRESSION OF THE SURFACE ANTIGEN *BRUCELLA ABORTUS* OMP16
IN *NICOTIANA BENTHAMIANA* PLANT**

Abstract. Brucellosis is one of the most contagious and infectious diseases with high incidence rates of cattle and humans in Kazakhstan. Using modern biotechnology techniques to develop vaccines that are reliable and affordable for farmers is an alternative solution to the problem.

Plant viruses are often used as a vector for obtaining the expression of antigens of the pathogen. The grape virus A (BAB) is widely used among plant viruses. *Brucella* membrane proteins are the main objects of this research for further development of vaccines or diagnostic tests against brucellosis.

Membrane proteins (OMPs) are cell specific surface antigens that are immunogenic. OMPs are ideal candidates for the production of recombinant brucellosis vaccines.

The object of the study was the outer membrane protein (Omp16), which plays an important role in the suppression of TNF- α production in macrophages. In this study, molecular cloning and analysis of the expression of the Omp16 gene, which was used to express the recombinant protein in plants, was carried out. We selected brucella from the vaccine strain of *Brucella abortus* 19, and the plant *Nicotiana benthamiana*, as the subjects for our research, since they widely used for the production of recombinant proteins, and they both appropriate for molecular genetic research. A viral vector was constructed to express the brucellosis antigen Omp16 in *Nicotiana benthamiana* plants. Nineteen explants were used for the regeneration of transgenic plants. As a result of this studies, the introduced gene of Omp16 was under the subgenomic promoter control of the ORF4 and was successfully expressed while maintaining the efficiency of expression in transgenic plants. The efficiency of viral vectors was evaluated at the level of transcription during expression of the protein Omp16 with viral proteins. The entire leaf blade was infiltrated; the density of *Agrobacteria* was 0.7. We were able to obtained transgenic plants *Nicotiana benthamiana* carrying the gene of capsid protein BAB, and the expression of the membrane antigen Omp16 in the viral vector was achieved by replacing the ORF4 with the Omp16 gene. The development of transgenic plants was carried out using agrobacterial transformation.

Key words: *Brucella abortus* 19, membrane proteins, Omp16, gene expression, recombinant proteins.

Information about authors:

Ilgekbaeva Gulnaz D., Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Department of Biological Safety, Faculty of Veterinary Medicine, KazNAU, Almaty, Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0001-7140-2961>;

Makhshov Edil Sh., candidate of Veterinary Sciences, Acting Professor, Department of Biological Safety, Faculty of Veterinary Medicine, KazNAU, Almaty, Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0003-1922-7144>;

Tulepova Gulmira, doctoral student, Department of Biological Safety, Faculty of Veterinary Medicine, KazNAU, Almaty, Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0002-0681-3788>;

Yessimkhankyzy Dana, master student, Department of Biological Safety, Faculty of Veterinary Medicine, KazNAU, Almaty, Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0001-7035-913X>;

Sadiev Sagypash T., director of the Center for Applied Agricultural Research, KazNAU, Almaty, Kazakhstan; sadiev15@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1470-2612>

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Saxena J., Rawat S. (2014). “Edible vaccines,” in *Advances in Biotechnology*, pp. 207–226.
- [2] V. Doshi V., H. Rawal H., and Mukherjee S. (2013). “Edible vaccines from GM crops: current status and future scope. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, vol. 2, no. 3, pp. 1–6.
- [3] Gritsenko D.A., Kenzhebekova R., Deryabina N.D., Galiakparov N.N. (2019). Development of a “deconstructed” vector based on the genome of grapevine virus A. *Plant Biotechnol Rep.* Vol. 13, Issue 2.
- [4] Cassataro J., Velikovskiy C.A., De la Barrera S., et al. (2005). *Infect Immun.* 73(10):6537–46.
- [5] Winter A. (1987). Outer membrane proteins of *Brucella*. *Ann Inst. Pasteur/Microbiol.* 1987. 138:87–89.
- [6] Tibor A., Weynants V., Denoel P., et al. (1994). Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to PAL lipoproteins. *Infect Immun.* 62:3633–3639.
- [7] Ермилова, Е.В. (2012). Молекулярные аспекты адаптации прокариот: монография/Е.В. Ермилова. 2-е изд., Санкт-Петербург: Химиздат, 342 с.
- [8] Ильгекбаева Г.Д., Махашов Е.Ш., Тулепова Г., Садиев С.Т. (2019). Клонирование и экспрессия белка наружной мембраны бруцеллы Omp16. Исследования, результаты. № 3 (83) ISSN 2304-3334.
- [9] Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. (1999) *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th edn., New York: Wiley.
- [10] Galiakparov N., Tanne E., Sela I., Gafny R. (2003). Functional analysis of the grapevine virus A genome//*Virology*. 003. V. 306. P.42–50.
- [11] Lewandowski, D.J., Dawson, W.O. (1998). Deletion of internal sequences results in tobacco mosaic virus defective RNAs that accumulate to high levels without interfering with replication of the helper virus//*Virology*. Vol. 251.P. 427–437.
- [12] Rubinson E., Galiakparov N., Radian S., et al. (1997). Serological detection of grapevine virus A using antiserum to a nonstructural protein, the putative movement protein//*Phytopathology*, Vol. 87. P. 1041–1045.