

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 575.224:631.528:633.71

doi: 10.17223/19988591/33/8

**Е.А. Уварова¹, А.А. Загорская¹, С.Г. Поздняков²,
Е.В. Дейнеко^{1,3}, С.Н. Щелкунов^{1,4}**

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

²Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³Национальный исследовательский
Томский государственный университет, г. Томск, Россия

⁴Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет, г. Новосибирск, Россия

Вариабельность накопления S-антигена вируса гепатита В в корнеплодах и листьях индивидуальных трансгенных растений моркови

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН VI.62.1.5. «Разработка и совершенствование генетических конструкций для оптимизации экспрессии целевых генов и синтеза рекомбинантных белков медицинского назначения у трансгенных растений и животных».

Исследовано накопление поверхностного вирионного белка HBsAg вируса гепатита В человека в корнеплодах и листьях индивидуальных трансгенных растений моркови. В геном растений моркови был перенесен ген, кодирующий один из белков вирусной оболочки, а именно короткий S-антиген под управлением 35S промотора вируса мозаики цветной капусты Cauliflower mosaic virus (CaMV). Изучено соотношение количества HBsAg в листьях и корнеплодах у каждого индивидуального растения. Установлено, что среди изученных растений моркови только у двух соотношение между накоплением HBsAg в листьях и корнеплодах было близко к равнозначному. У других растений количество HBsAg в листьях преобладало над количеством в корнеплодах (восемь растений) или количество HBsAg в корнеплодах преобладало над количеством в листьях (три растения). Обсуждаются возможные причины отсутствия прямой корреляции между уровнем накопления HBsAg в тканях корнеплодов и листьев исследуемых трансгенных растений моркови.

Ключевые слова: *Daucus carota*; HBsAg; агробактериальная трансформация; CaMV35S-промотор; вариабельность накопления антигена.

Введение

Для вакцинации против вирусного гепатита В человека используется поверхностный рекомбинантный антиген HBsAg, синтезируемый клетками дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*). Несмотря на антигенную и иммунологическую эквивалентность белков (рекомбинантного и белка, вы-

деленного из сыворотки носителей вируса гепатита В), вакцина, полученная в дрожжевой системе экспрессии, не лишена недостатков и требует ее дальнейшего улучшения. HBsAg входит в состав белков оболочки вирусной частицы, его образование кодируется геном *env*. С нуклеотидной последовательности этого гена за счет особенностей организации рамки считывания синтезируется три белка, являющихся компонентами белковой оболочки вируса: короткий (S, или HBsAg), средний (M, или preS2-HBsAg) и большой (L, или preS1-preS2-HBsAg). Все три белка, входящие в состав вирусной оболочки, обладают иммуногенными свойствами и используются при разработке рекомбинантных вакцин. Использование для иммунизации двух или всех трех поверхностных антигенов одновременно приводит к повышению иммуногенности вакцинного препарата [1, 2]. S-, M- и L-антигены обычно производятся в системах экспрессии на основе дрожжей [3] или клеток млекопитающих [2, 4].

Тревожная ситуация, сложившаяся в связи с распространением вируса гепатита В не только в нашей стране, но и в мире, вызванная многими причинами, в том числе и проблемами в области профилактики, стимулировала исследования по созданию недорогих широко доступных и эффективных вакцин.

В настоящее время генетически модифицированные растения рассматриваются как перспективная альтернативная экспрессионная платформа для получения рекомбинантных белков медицинского назначения, в том числе и для получения вакцинных белков, в частности рекомбинантных антигенов вируса гепатита В. Первым антигеном, полученным в растительной системе экспрессии для вакцинации человека в виде инъекций, а также для пероральной иммунизации, был S-антиген вируса гепатита В [5–7]. Для увеличения выхода рекомбинантного белка в стабильной системе экспрессии, т.е. при интеграции чужеродного гена в ядерный или хлоропластный геномы растения, исследователями использовались как активные промоторы, так и различные генетические элементы, усиливающие экспрессию целевого гена. Положительный эффект в усилении экспрессии S-HBsAg в растительных клетках был связан с общим типом метаболизма клеток [8]. Например, относительно высокое содержание S-HBsAg-иммуногена наблюдалось в суспензионных культурах клеток, в которых антиген секретировался в среду для культивирования [9].

Хорошо охарактеризованный конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV), обеспечивающий транскрипцию молекулы 35S РНК CaMV и называемый соответственно P35S [10], широко используется в экспериментах по созданию трансгенных растений. CaMV35S-промотор обеспечивает достаточно высокий уровень экспрессии трансгена у двудольных растений и несколько менее эффективен у однодольных [11, 12]. По данным некоторых исследователей, эффективность промотора CaMV35S в обеспечении высокого уровня экспрессии трансгена не всегда одинакова во всех клетках и тканях трансгенного растения [13, 14].

Известно, что при агробактериальной трансформации растений интеграция целевых генов в составе генетической конструкции происходит слу-

чайным образом в различные участки разных хромосом, поэтому каждое трансгенное растение индивидуально по месту встройки и числу встроенных копий трансгена [15]. Установлено, что уровень экспрессии трансгена, находящегося под контролем CaMV35S, может значительно варьировать у разных трансгенных растений, полученных в одном эксперименте. Таким образом, уровень экспрессии трансгена часто зависит от его положения в растительном геноме (близость или удаленность от сильных промоторов, усилителей или глушителей транскрипции и т.п.), метилирования ДНК и модификации гистонов в области промотора [14, 16–19].

С развитием методов геномного и транскриптомного анализов экспериментально было установлено, что экспрессия большого числа генов в разных органах (например, в листьях и корнях) одного и того же растения, как правило, существенно различается [20–22]. Полученные данные о различиях в накоплении транскриптов одних и тех же генов, экспрессирующихся в разных тканях растения, наводят на мысль о различиях в уровне накопления рекомбинантных белков в разных органах и тканях среди индивидуальных трансгенных растений. Однако данные о том, как индивидуальные трансгенные растения различаются по относительному уровню синтеза рекомбинантного белка в разных органах и тканях растения, в имеющейся доступной литературе весьма малочисленны.

В связи с этим целью данного исследования послужил сравнительный анализ накопления HBsAg-антигена в различных органах – корнеплодах и листьях индивидуальных трансгенных растений моркови, несущих ген, кодирующий S-белок, под контролем промотора CaMV35S.

Материалы и методики исследования

В качестве бинарного вектора для трансформации растений использовали плазмиду pBINPLUS/ARS (рис. 1, *a*), любезно предоставленную Dr. R.W. Hammond (USDA, USA). По сайтам эндонуклеаз рестрикции *Hind*III-*Acc*65I в состав pBINPLUS/ARS встраивали кодирующую последовательность HBsAg (GenBank V00867.1), находящуюся под контролем промотора CaMV35S (435 п.н.) и ограниченную с 3'-конца последовательностью сигнала полиаденилирования мРНК CaMV (polyA, 202 п.н.) (рис. 1, *b*) [23].

Трансформацию клеток моркови (*Daucus carota* L.) проводили методом агробактериального переноса. В качестве эксплантов использовали эмбриогенный каллус, индуцированный из зрелых зародышей моркови сорта Нантская 4. Ночную культуру *Agrobacterium tumefaciens*, плотностью 1 о.е. при 600 нм, предварительно разбавляли средой MS в соотношении 1:3. После ко-культивирования с агробактерией в течение 3 сут в темноте и при температуре 22°C экспланты переносили на среду MS с добавлением 0,2 мг/л кинетина и 0,2 мг/л 2,4-Д, содержащую 500 мг/л цефотаксима для подавления роста агробактерии и 100 мг/л канамицина в качестве селективного агента. Пассирование каллусов на свежую среду аналогичного состава проводили

каждые 3–4 нед до начала эмбриогенеза. Хорошо сформировавшиеся эмбриониды с развивающейся первой листовой пластинкой переносили на безгормональную среду MS с канамицином (100 мг/л) и цефотаксимом (500 мг/л) для развития трансгенных растений-регенерантов. Растения с хорошо развитой корневой системой и розеткой листьев выращивали в условиях теплицы на гидропонной культуре при освещенности 20 тыс. лк, световом периоде 18/6 часов и суточных колебаниях температуры 18–25°C [24].

Геномную ДНК растений выделяли по стандартной методике [25]. Наличие перенесенного гена в геномной ДНК растений моркови подтверждали ПЦР с использованием пары праймеров (см. рис. 1, *b*, указано стрелками): S1 5'CCG-CAAATCACCAGTCTCT3' и S2 5'GGGTAACGCCAGGGTTTT3'. ПЦР проводили в 10 мкл буфера, содержащего 67 мМ трис-HCL (pH 8,9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01% Tween 20, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 200 мкМ dNTP, 10 пМ праймеров, 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («Биосан», г. Новосибирск) с использованием амплификатора «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: первый цикл: 95°C – 3 мин; пять циклов 95°C – 10 с, 63°C – 10 с, 72°C – 18 с; двадцать восемь циклов 95°C – 10 с, 62°C – 10 с, 72°C – 18 с. Электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле в 1xTAE буфере.

Белковые экстракты из тканей растений получали по ранее описанному методу [6] с небольшой модификацией: 1 г листьев или корнеплода моркови (отдельно для каждого растения) растирали в ступке с жидким азотом. Навеску полученного порошка (500 мг) помещали в 1,5 мл пробирку и добавляли 500 мкл дистиллированной воды. Эту смесь инкубировали в течение одного часа на шейкере при комнатной температуре, затем оставляли на ночь при температуре +4°C для экстракции. Экстракт центрифугировали 30 мин с ускорением 16 000 об/мин, супернатант ресуспендировали и вновь центрифугировали 40 мин с ускорением 20 000 об/мин на центрифуге Beckman J2-21 (США), ротор JA-20. Полученный супернатант анализировали методом ИФА на наличие HBsAg, используя набор «Вектогеп В-HBs-антиген D-0556» («Вектор-Бест», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Экстракцию белка из тканей одних и тех же растений проводили независимо дважды, с интервалом 2 дня. Между анализами образцы растений хранили при +4°C. Для сравнительного анализа содержания HBsAg в тканях различных органов (листья и корнеплоды) из 27 трансформантов было отобрано 13 трансгенных растений моркови, в экстрактах из которых был обнаружен целевой белок.

Используемые в работе олигонуклеотиды синтезированы в ЦКП по синтезу олигонуклеотидов и их аналогов (ИЦИГ СО РАН). Работы по определению первичной структуры последовательностей ДНК выполнены в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). Генетически модифицированные растения моркови выращивали в ЦКП «Лаборатория искусственного выращивания растений» (ИЦИГ СО РАН, г. Новосибирск).

Статистическая обработка материала и построение графика проведены с помощью программы Microsoft Excel 2010.

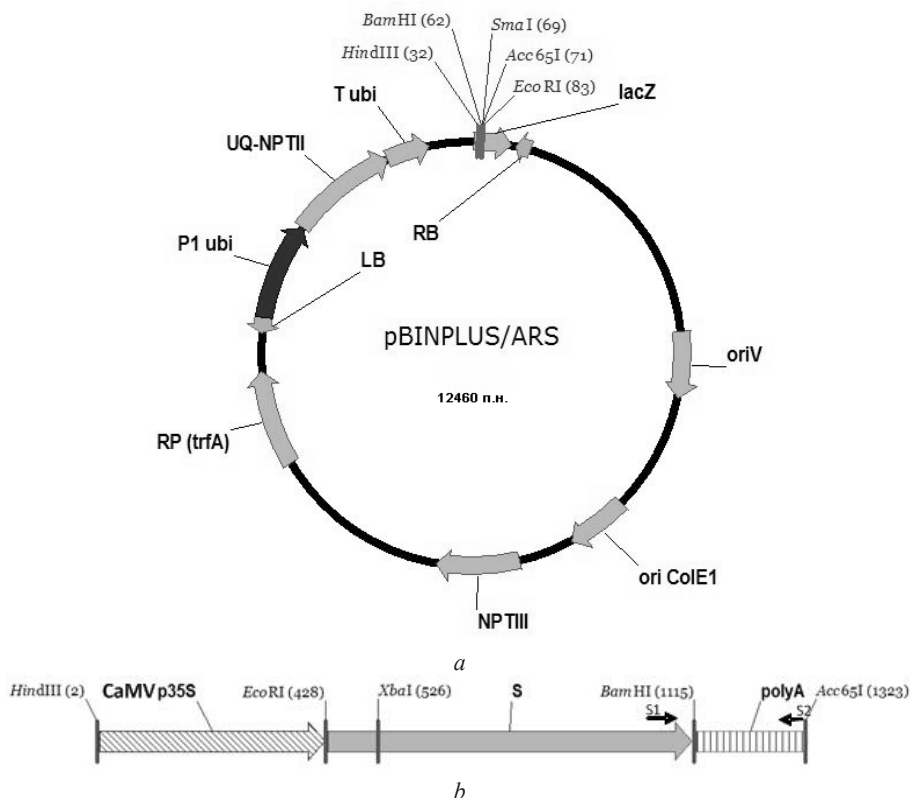


Рис. 1. Схема бинарного вектора pBINPLUS/ARS и целевого фрагмента: *a* – структура бинарного вектора для агробактериальной трансформации растений pBINPLUS/ARS [26]. RB и LB – концевые повторы T-ДНК плазмиды Ti; oriV, ori CoLE1; RP(trfA) (relaxosome protein RP) – генетические элементы плазмиды с широким кругом хозяев; nptIII – ген устойчивости к канамицину (белок аминогликозид 3' фосфотрансфераза), функционирующий в бактериях; P1ubi-UQ-nptII-Tubi – гибридный ген ubiquitin-NPTII, экспрессирующийся в растениях и обеспечивающий устойчивость к канамицину; P1ubi, Tubi – промотор и терминатор гена ubi, кодирующего убиквитин; lacZ – структурный ген лактозного оперона, генетический элемент, позволяющий проводить цветовую селекцию колоний. *b* – фрагмент ДНК 1328 пн, который встраивали в вектор pBINPLUS/ARS по сайтам HindIII-Acc65I, p35S – последовательность промотора P35S; S – последовательность ДНК, кодирующая HBsAg; стрелками указаны места, комплементарные праймерам S1 и S2 (см. текст) [Fig. 1. Scheme of the binary vector pBINPLUS/ARS and the target fragment: *a* - the structure of the binary vector for agrobacterium-mediated plant transformation pBINPLUS/ARS [26]. RB and LB are terminal repeats in the T-DNA plasmid Ti; oriV, ori CoLE1; RP(trfA) (relaxosome protein RP) are plasmid genetic elements with a broad host range; nptIII is kanamycin resistance gene (Aminoglycoside 3'-phosphotransferase) functioning in bacteria; P1ubi-UQ-nptII-Tubi is ubiquitin-NPTII hybrid gene expressed in plants and providing resistance to kanamycin; P1ubi, Tubi are ubi gene promoter and terminator, encoding ubiquitin; lacZ is a structural gene of the lac operon, genetic element, allowing to carry out color selection of colonies. *b* - the 1328 bp DNA fragment which was inserted into pBINPLUS/ARS vector at HindIII-Acc65I sites, p35S is P35S promoter sequence; S is DNA sequence encoding HBsAg; the arrows indicate places complementary to S1 and S2 primers (see the text)]

Результаты исследования и обсуждение

В результате агробактериальной трансформации было получено 27 трансгенных растений моркови, содержащих последовательность гена, кодирующего короткий S-белок, или HBsAg вируса гепатита В, находящуюся под контролем конститутивного промотора CaMV35S. Трансгенный статус полученных трансформантов подтверждали методом ПЦР (рис. 2).

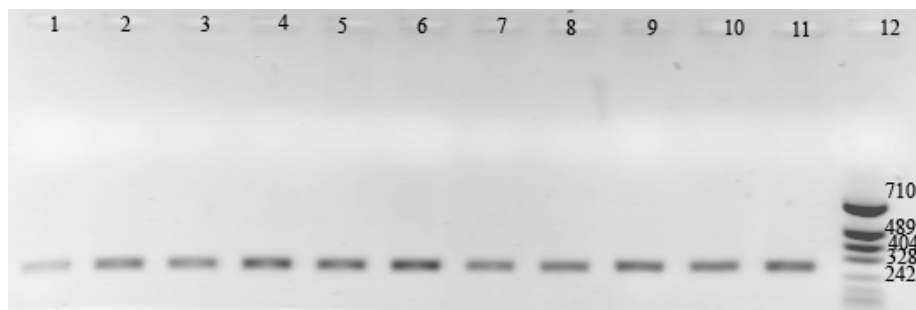


Рис. 2. ПЦР-анализ трансгенных растений моркови, содержащих последовательность ДНК, кодирующую HBsAg, в 2% агарозном геле. 1–10 трансгенные растения, содержащие целевой ген; 11 – положительный контроль (плазмидная ДНК); 12 – маркер длин фрагментов ДНК плазмиды pBluescriptSK(+)/ MspI.

[Fig. 2. PCR analysis of transgenic carrot plants containing DNA sequence encoding HBsAg, in 2% agarose gel. 1-10 - are transgenic plants containing a target gene; 11 - is positive control (plasmid DNA); 12 - is length marker of pBluescriptSK(+)/ MspI plasmid DNA fragments]

Присутствие на фореграмме полос на дорожках 1–10, размер которых соответствовал ожидаемому, свидетельствовало о наличии целевой последовательности в геноме исследуемых растений моркови.

Из 27 белковых экстрактов растений были выбраны 13, содержащие по данным ИФА целевой белок в детектируемых ИФА количествах. Результаты сравнительного анализа накопления HBsAg как в листьях, так и в корнеплодах индивидуальных трансгенных растений представлены на рис. 2. Среднее содержание исследуемого рекомбинантного антигена в листьях составило 9,43 нг/г сырой массы и в корнеплодах – 4,57 нг/г. Между индивидуальными растениями наблюдалась вариабельность в накоплении HBsAg как в листьях, так и в корнеплодах. Изменчивость по накоплению анализируемого антигена составила от 0,1 до 20,69 нг/г сырой массы в тканях листьев и от 0,34 до 12,07 нг/г в тканях корнеплодов исследуемых трансгенных растений моркови (см. рис. 2).

Как видно из представленных на рис. 3 данных, при сравнении индивидуальных растений моркови наблюдаемая вариабельность HBsAg не была равнозначной по его накоплению в тканях корнеплодов и листьев, т.е. высокий уровень антигена в листьях не соответствовал таковому в корнеплодах,

и наоборот. Несмотря на то, что последовательность гена, кодирующего HBsAg в составе генетической конструкции, находилась под управлением конститутивного CaMV35S-промотора, обеспечивающего экспрессию трансгена во всех тканях трансгенного растения, по результатам сравнительного анализа среди исследуемых растений нами выделены три группы.

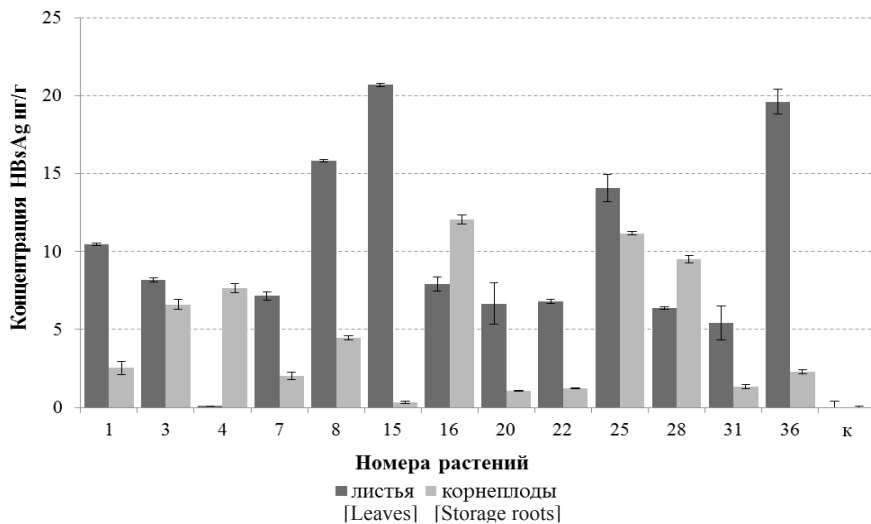


Рис. 3. Содержание HBsAg в листьях и корнеплодах трансгенных растений моркови (нг/г сырой массы):

1–36 – номера выбранных трансгенных растений

[Fig. 3. HbsAg concentration in leaves and storage roots of transgenic carrot plants (ng/g fresh weight). 1-36 are selected transgenic plants. On the Y-axis - HbsAg concentration; on the X-axis - Numbers of selected transgenic plants]

В первую группу вошли только два растения (№ 3 и 25), у которых соотношение между накоплением HBsAg-антигена в листьях и корнеплодах было близко к равнозначному. Ко второй группе были отнесены растения, у которых количество HBsAg в листьях превышало количество этого антигена, выявляемое в корнеплодах (№ 1; 7; 8; 15; 20; 22; 31 и 36). У растений третьей группы накопление HBsAg в корнеплодах преобладало в пользу его накопления в листьях (№ 4; 16 и 28).

Удобными моделями для выявления особенностей экспрессии чужеродных генов под управлением различных промоторов, как тканеспецифичных, так и конститутивных, являются трансгенные растения, в геном которых интегрированы репортерные гены, такие как *gfp*, кодирующий зеленый флюоресцирующий белок, или *uidA*, кодирующий фермент бета-глюкуронидазу. На основании сравнительного анализа активности бета-глюкуронидазы, синтезируемой в различных органах и тканях у разных видов трансгенных растений, установлено, что в листьях трансгенных растений табака CaMV 35S-промотор обеспечивает более высокую экспрессию *uidA*-гена по срав-

нению с листьями трансгенных растений люцерны, канолы или *Arabidopsis thaliana* [27]. Отмечена вариабельность по активности бета-глюкуронидазы в различных тканях трансгенных растений табака – в листьях и стеблях активность фермента была значительно выше, чем в цветках и семенах [26, 27]. У трансгенных растений люцерны высокая активность фермента бета-глюкуронидазы наблюдалась в листьях, стеблях и корнях, однако CaMV 35S-промотор не был активен в клетках кортикального слоя корней и в симбиотической зоне корневых волосков, где активность фермента не детектировалась [28].

У трансгенных растений моркови с геном *uidA* под контролем CaMV35S-промотора, а также «двойного» CaMV35S-промотора активность фермента бета-глюкуронидазы была выше в листьях по сравнению с корнеплодами [29]. Полученные нами данные о соотношении среднего количества целевого белка в листьях и корнеплодах трансгенных растений моркови в целом хорошо согласуются с данными Уэлли и соавт. [29]. Однако при оценке индивидуальных трансгенных растений выявляются некоторые несоответствия в соотношениях средних количеств HBsAg между анализируемыми органами растения. Выявленные несоответствия, вероятнее всего, отражают эффект положения трансгена в геноме трансгенного растения, связанный с тем, что тканеспецифичные промоторы генов из геномного окружения области инсерции трансгена могли модулировать активность CaMV35S-промотора. Возможность изменения активности промоторов растительных генов в районе интеграции *uidA*-гена под управлением CaMV35S-промотора продемонстрирована в исследованиях Женг и соавт. [30]. Полученные в данной работе результаты подчеркивают необходимость проведения селекции наиболее продуктивных по целевому белку трансгенных растений по результатам анализа накопления этого белка в соответствующих целевых для технологической переработки тканях/органах растения (например, в корнеплодах моркови, плодах томатов, зернах риса), а не в листьях проростков, что обычно осуществляется на ранних этапах изучения получаемых трансгенных растений.

Заключение

Проанализировано накопление HBsAg в листьях и корнеплодах трансгенной моркови. Обнаружена вариабельность в уровне накопления этого антигена как в листьях, так и в корнеплодах исследованных растений. Кроме того, нами не обнаружена прямая корреляции между уровнем накопления целевого белка в листьях и корнеплодах индивидуальных растений.

Литература

1. Zuckerman J.N., Sabin C., Craig J., Williams A., Zuckerman A.J. Immune response to a new hepatitis B vaccine in healthcare workers who had not responded to standard vaccine: randomised double blind dose-response study // *BMJ*. 1997. Vol. 314, № 7077. P. 329–333.

2. *Showval D., Roggendorf H., Roggendorf M.* Enhanced immune response to hepatitis B vaccination through immunization with a Pre-S1/Pre-S2/S Vaccine // *Med. Microbiol. Immunol.* 2015. Vol. 204, № 1. P. 57–68.
3. *Brocke P., Schaefer S., Melber K., Jenzelewski V., Müller F., Dahlems U., Bartelsen O., Park K.-N., Janowicz Z.A., Gellissen G.* Recombinant Hepatitis B Vaccines: Disease Characterization and Vaccine Production // *Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems* / ed. Gellissen G. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004. P. 319–359.
4. *Showval D., Ilan Y., Adler R., Deepen R., Panet A., Even-Chen Z., Gorecki M., Gerlich W.H.* Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines // *Vaccine.* 1994. Vol. 12, № 15. P. 1453–1459.
5. *Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J.* Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992. Vol. 89, № 24. P. 11745–11749.
6. *Thanavala Y., Yang Y.F., Lyons P., Mason H.S., Arntzen C.* Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. Vol. 92, April. P. 3358–3361.
7. *Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., Pniewski T., Letellier M., Lisowa O., Yusibov V., Koprowski H., Plucienniczak A., Legocki A.B.* A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus // *FASEB J.* 1999. Vol. 13, № 13. P. 1796–1799.
8. *Pniewski T.* The twenty-year story of a plant-based vaccine against hepatitis B: Stagnation or promising prospects? // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14, № 1. P. 1978–1998.
9. *Sunil Kumar G.B., Ganapathi T.R., Revathi C.J., Prasad K.S.N., Bapat V.A.* Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures // *Protein Expr. Purif.* 2003. Vol. 32, № 1. P. 10–17.
10. *Odell J.T., Nagy F., Chua N.-H.* Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter // *Nature.* 1985. Vol. 313, № 6005. P. 810–812.
11. *Batraw M.J., Hall T.C.* Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants // *Plant Mol. Biol.* 1990. Vol. 15, № 4. P. 527–538.
12. *Benfey P.N., Ren L., Chua N.H.* Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development // *EMBO J.* 1990. Vol. 9, № 6. P. 1677–1684.
13. *Potenza C., Aleman L., Sengupta-Gopalan C.* Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation // *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant.* 2004. Vol. 40, № 1. P. 1–22.
14. *Okumura A., Shimada A., Yamasaki S., Horino T., Iwata Y., Koizumi N., Nishihara M., Mishiba K.* CaMV-35S promoter sequence-specific DNA methylation in lettuce // *Plant Cell Rep.* Springer Berlin Heidelberg, 2016. Vol. 35, № 1. P. 43–51.
15. *Hansen G., Chilton M.D.* Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999. Vol. 240. P. 21–57.
16. *Mlynarova L., Keiser L.P.C., Stiekema W., Nap J.-P.* Approaching the Lower Limits of Transgene Variability // *Plant Cell.* 1996. Vol. 8, № 9. P. 1589–1599.
17. *Щелкунов С.Н., Саляев Р.К., Рыжова Т.С., Поздняков С.Г., Нестеров А.Е., Рекославская Н.И., Сулцова В.М., Пакова Н.В., Мишутина У.О., Копытина Т.В., Хэммонд Р.В.* Создание кандидатной съедобной вакцины против вируса гепатита В и иммунодефицита человека на основе трансгенного томата // *Вестник РАМН.* 2004. № 11. С. 50–51.
18. *Filipecki M., Malepszy S.* Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. // *J. Appl. Genet.* 2006. Vol. 47, № 4. P. 277–286.
19. *Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Поздняков С.Г., Филлипенко Е.А., Пермякова Н.В., Сидорчук Ю.В., Уварова Е.А., Позднякова Л.Д., Шумный В.К., Власов В.В.,*

- Хэммонд Р.В., Щелкунов С.Н. Анализ продукции М-антигена вируса гепатита В в листьях трансгенных растений моркови // Доклады РАН. 2009. Т. 425, № 3. С. 400–403.
20. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray // Science (80). 1999. Vol. 70, № 270. P. 467–470.
 21. Galbraith D.W., Birnbaum K. Global studies of cell type-specific gene expression in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. Vol. 57, № 1. P. 451–475.
 22. Brenner W.G., Schumling T. Transcript profiling of cytokinin action in Arabidopsis roots and shoots discovers largely similar but also organ-specific responses // BMC Plant Biol. 2012. Vol. 12. P. 112.
 23. Koncz C., Martini N., Szabadosz L., Hrouda M., Bachmair A., Schell J. Specialized vectors for gene tagging and expression studies // Plant Molecular Biolog. Manual / ed. by S.B. Gelwin, R.A. Schilperoot. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1994. P. 53–74.
 24. Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Власов В.В., Сенников С.В., Якушенко Е.В., Филипенко Е.А., Загорская А.А., Козлов В.А., Шумный В.К., Филипенко М.Л. Способ получения трансгенных растений моркови, продуцирующих интерлейкин-10 человека. Патент RU 2374321. 2009.
 25. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Res. 1980. Vol. 8, № 19. P. 4321–4326.
 26. Garbarino J.E., Belknap W.R. Expression of Its Promoter in Transgenic Plants // Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 24. P. 119–127.
 27. Malik K., Wu K., Li X-Q., Martin-Heller T., Hu M., Foster E., Tian L., Wang C., Ward K., Jordan M., Brown D., Gleddie S., Simmonds D., Zheng S., Simmonds J., Miki B. A constitutive gene expression system derived from the tCUP cryptic promoter elements // Theor. Appl. Genet. 2002. Vol. 105, № 4. P. 505–514.
 28. Samac D.A., Tesfaye M., Dornbusch M., Saruul P., Temple S.J. A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*) // Transgenic Res. 2004. Vol. 13, № 4. P. 349–361.
 29. Wally O., Jayaraj J., Punja Z.K. Comparative expression of β -glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues // Plant Cell Rep. 2008. Vol. 27, № 2. P. 279–287.
 30. Zheng X., Deng W., Luo K., Duan H., Chen Y., McAvoy R., Song S., Pei Y., Li Y. The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters // Plant Cell Rep. 2007. Vol. 26, № 8. P. 1195–1203.

Поступила в редакцию 15.10.2015 г.; повторно 25.02.2016 г.; принята 10.03.2016 г.

Авторский коллектив:

Уварова Елена Александровна – канд. биол. наук, н.с. лаборатории биоинженерии растений Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия).

E-mail: uvarova@bionet.nsc.ru

Загорская Алла Алексеевна – н.с. лаборатории биоинженерии растений Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия).

E-mail: zagorska@bionet.nsc.ru

Поздняков Сергей Геннадьевич – канд. биол. наук, н.с. лаборатории медицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия).

E-mail: serpogen@gmail.com

Дейнеко Елена Викторовна – профессор, д-р биол. наук, зав. лабораторией биоинженерии растений Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия); профессор кафедры физиологии

растений и биотехнологии Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск, Россия).

E-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Щелкунов Сергей Николаевич – д-р биол. наук, в.н.с. лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия), профессор кафедры молекулярной биологии Национального исследовательского Новосибирского государственного университета (г. Новосибирск, Россия).

E-mail: snshchel@rambler.ru

Uvarova EA, Zagorskaya AA, Pozdnyakov SG, Deineko EV, Shchelkunov SN. Variability in the accumulation of hepatitis B virus S antigen in storage roots and leaves of individual transgenic carrot plants. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2016;1(33):126-139. doi: 10.17223/19988591/33/8 In Russian, English summary

**Elena A. Uvarova¹, Alla A. Zagorskaya¹, Sergey G. Pozdnyakov²,
Elena V. Deineko^{1,3}, Sergey N. Shchelkunov^{1,4}**

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

²*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

³*Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation*

⁴*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation*

Variability in the accumulation of hepatitis B virus S antigen in storage roots and leaves of individual transgenic carrot plants

The aim of this work was to assess the production level of hepatitis B virus S antigen (HBsAg) in storage roots and leaves of individual transgenic carrot plants carrying HBsAg gene under control of CaMV P35S promoter.

We transferred Gene env, encoding one of the proteins of the viral envelope, such as short S-antigen under control of the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV), into the genome of carrot plants. The level of HBsAg in leaves and roots was examined as the ratio of HBsAg in the leaves and roots of thirteen carrot plants was determined by ELISA accumulation individually, and especially HBsAg accumulation in various plant organs. As a binary vector for plant transformation we used pBINPLUS/ARS plasmid (Fig. 1a), kindly provided by Dr. RW Hammond (USDA, USA). At sites of restriction endonucleases *HindIII-Acc65I* we inserted HBsAg (GenBank V00867.1) coding sequence, under control of CaMV35S (435 bp) promoter and restricted at the 3'-end by the polyadenylation signal sequence mPHK CaMV (polyA, 202 bp), in pBINPLUS/ARS (Fig. 1b). Carrot cells (*Daucus carota* L.) were transformed by means of agrobacterium mediation. Genomic DNA of plants was isolated by the method of Murray MG and Thompson WF. The presence of the transformed gene in genomic DNA of carrot plants was confirmed by PCR using primer pairs (Fig. 1b)

We observed variability both in leaves and roots of the transgenic carrot in HBsAg accumulation. The HBsAg content in the leaves of the plants chosen for this comparative analysis varied from 0.1 to 20.69 ng/g of fresh weight, amounting on the average to 9.43 ng/g, and in the storage roots, from 0.34 to 12.07 ng/g, with an average of 4.57 ng/g. HBsAg content in the plant leaves selected for this comparative analysis varied from 0.1 to 20.69 ng/g fresh weight, amounting, on average, to 9.43 ng/g, and in the storage roots, from 0.34 to 12.07 ng/g, with an average of 4.57 ng/g. Among analyzed plant carrots there are only two (№ 3 and № 25) where the relationship

between HBsAg accumulation in leaves and roots was close to equal. Other plants were divided into two groups, the first group is where the ratio of HBsAg leaves prevailed over the number in the roots (eight plants) and the second group where the roots of HBsAg dominated the quantity in the leaves (three plants). We discussed possible reasons for the lack of a direct correlation between the level of HBsAg accumulating in the tissues of roots and leaves of the transgenic carrot. We found no direct correlation between the level of the target protein accumulation in leaves and storage roots of individual plants.

Funding: This work was supported by ICG SB RAS budget project VI.62.1.5. “Development and improvement of genetic constructions to optimize the expression of target genes and the synthesis of recombinant proteins for medical use in transgenic plants and animals”.

The article contains 3 Figures, 31 References.

Key words: *Nicotiana tabacum*; HBsAg; agrobacterium-mediated transformation; 35S promoter; different expression patterns.

References

1. Zuckerman JN, Sabin C, Craig, Williams A, Zuckerman AJ. Immune response to a new hepatitis B vaccine in healthcare workers who had not responded to standard vaccine: Randomised double blind dose-response study. *BMJ*. 1997;1(314):329-333. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.314.7077.329>
2. Shouval D, Roggendorf H, Roggendorf M. Enhanced immune response to hepatitis B vaccination through immunization with a Pre-S1/Pre-S2/S Vaccine. *Med Microbiol Immunol*. 2015;204(1):57-68. doi: [10.1007/s00430-014-0374-x](https://doi.org/10.1007/s00430-014-0374-x)
3. Brocke P, Schaefer S, Melber K, Jenzelewski V, Müller F, Dahlems U, Bartelsen O, Park K.-N, Janowicz ZA, Gellissen G. Recombinant hepatitis B vaccines: disease characterization and vaccine production. In: *Production of recombinant proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Systems*. Gellissen G, editor. Germany Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA: Weinheim; 2005. pp. 319-359. doi: [10.1002/3527603670.ch15](https://doi.org/10.1002/3527603670.ch15)
4. Shouval D, Ilan Y, Adler R, Deepen R, Panet A, Even-Chen Z, Gorecki M, Gerlich W.H. Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines *Vaccine*. 1994;12(15):1453-1459. doi: [10.1016/0264-410X\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90155-4)
5. Mason HS, Lam DM-K, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89(24):11745-11749
6. Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995;92(8):3358-3361. doi: [10.1073/pnas.92.8.3358](https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3358)
7. Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J*. 1999;13(13):1796-1799. PMID: [10506582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10506582/)
8. Pniewski T. The twenty-year story of a plant-based vaccine against hepatitis B: stagnation or promising prospects? *Int. J. Mol. Sci*. 2013;14(1):1978-1998. doi: [10.3390/ijms14011978](https://doi.org/10.3390/ijms14011978)
9. Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Prasad KSN, Bapat VA. Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. *Prot. Exp. Purif*. 2003;32(1):10-17. doi: [10.1016/j.pep.2003.07.004](https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.07.004)
10. Odell JT, Nagy F, Chua N-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 1985;313(6005):810-812. doi: [10.1038/313810a0](https://doi.org/10.1038/313810a0)

11. Battraw MJ, Hall TC. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-beta-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Mol Biol.* 1990;15(4):527-38. doi: [10.1007/BF00017828](https://doi.org/10.1007/BF00017828)
12. Benfey PN, Ren L, Chua NH. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J.* 1990;9(6):1677-1684. PMC [551870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/551870/)
13. Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. In *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2004;40(1):1-22. doi: [10.1079/IVP2003477](https://doi.org/10.1079/IVP2003477)
14. Okumura A, Shimada A, Yamasaki S, Horino T, Iwata Y, Koizumi N, Nishihara M, Mishiba K. CaMV-35S promoter sequence-specific DNA methylation in lettuce. *Plant Cell Rep.* 2016;35(1):43-51. doi: [10.1007/s00299-015-1865-y](https://doi.org/10.1007/s00299-015-1865-y)
15. Hansen G, Chilton MD. Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe. In: *Plant Biotechnology. New Products and Application.* Hammond J, McGarvey P, Yusibov V, editors. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1999; pp. 21-58. doi: [10.1007/978-3-642-60234-4_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60234-4_2)
16. Mlynarova L, Keiser LPC, Stiekema W, Nap J-P. Approaching the lower limits of transgene variability. *Plant Cell.* 1996; 8(9):1589-1599. doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.8.9.1589>.
17. Shchelkunov SN, Salyaev RK, Ryzhova TS, Pozdnyakov SG, Nesterov AE, Rekoslavskaya NI, Sumtsova VM, Pakova NV, Mishutina UO, Kopytina TV, Hammond RV. Designing (on the basis of a transgenic tomato) of a candidate edible vaccine against hepatitis B and HIV. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2004;11:50-51. In Russian, English summary.
18. Filipecki M, Malepszy S. Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *J Appl Genet.* 2006;47(4):277-286. PMID: [17132892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17132892/)
19. Deineko EV, Zagorskaya AA, Filipenko EA, Permyakova NV, Sidorchuk YuV, Shumny VK, Vlasov VV, Pozdnyakov SG, Uvarova EA, Pozdnyakova LD, Shchelkunov SN, Hammond RV. Comparative analysis of HBV M-antigen production in leaves of individual transgenic carrot plants. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2009;425:76-79. doi: [10.1134/S1607672909020057](https://doi.org/10.1134/S1607672909020057)
20. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995;270(5235):467-470. doi: [10.1126/science.270.5235.467](https://doi.org/10.1126/science.270.5235.467)
21. Galbraith DW, Birnbaum K. Global studies of cell type-specific gene expression in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2006; 57:451-475. doi: [10.1146/annurev.arplant.57.032905.105302](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105302)
22. Brenner WG, Schmulling T. Transcript profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* roots and shoots discovers largely similar but also organ-specific responses. *BMC Plant Biol.* 2012;12:112. doi: [10.1186/1471-2229-12-112](https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-112)
23. Koncz C, Martini N, Szabadosz L, Hrouda M, Bachmair A, Schell J. Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In: *Plant Molecular Biology. Manual.* Gelwin SB, Schilperoort RA, editors. Netherland Dordrecht: Kluwer Academic Publ.; 1988. pp. 53-74.
24. Sidorchuk YuV, Deineko EV, Vlasov VV, Sennikov SV, Yakushenko EV, Filipenko EA, Zagorskaya AA, Kozlov VA, Shumny VK, Filipenko ML. Method of growing transgenic carrot plants, which produce human interleukin-10 (RU 2374321). 2009. In Russian
25. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(19):4321-4325. doi: [10.1093/nar/8.19.4321](https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321)
26. Garbarino JE, Belknap WR. Isolation of a ubiquitin-ribosomal protein gene (ubi3) from potato and expression of its promoter in transgenic plants. *Plant Mol Biol.* 1994;24:119-27. doi: [10.1007/BF00040579](https://doi.org/10.1007/BF00040579)
27. Malik K, Wu K, Li X-Q, Martin-Heller T, Hu M, Foster E, Tian L, Wang C, Ward K, Jordan M, Brown D, Gleddie S, Simmonds D, Zheng S, Simmonds J, Miki B. A constitutive gene

- expression system derived from the tCUP cryptic promoter elements. *Theor Appl Genet.* 2002;105(4):505-514. doi: [10.1007/s00122-002-0926-0](https://doi.org/10.1007/s00122-002-0926-0)
28. Samac DA, Tesfaye M, Dornbusch M, Saruul P, Temple SJ. A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research.* 2004;13(4):349-361. doi: [10.1023/B:TRAG.0000040022.84253.12](https://doi.org/10.1023/B:TRAG.0000040022.84253.12)
29. Wally O, Jayaraj J, Punja ZK. Comparative expression of beta-glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues. *Plant Cell Rep.* 2008;27(2):279-287. doi: [10.1007/s00299-007-0461-1](https://doi.org/10.1007/s00299-007-0461-1)
30. Zheng X, Deng W, Luo K, Duan H, Chen Y, McAvoy R, Song S, Pei Y, Li Y. The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. *Plant Cell Rep.* 2007;26(8):1195-1203. doi: [10.1007/s00299-007-0307-x](https://doi.org/10.1007/s00299-007-0307-x)

Received 15 October, 2015;

Revised 25 February, 2016;

Accepted 10 March, 2016

Author info:

Uvarova Elena A, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Plant Bioengineering, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

E-mail: uvarova@bionet.nsc.ru

Zagorskaya Alla A, Researcher, Laboratory of Plant Bioengineering, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

E-mail: zagorska@bionet.nsc.ru

Pozdnyakov Sergei G, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8 Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

E-mail: serpogen@gmail.com

Deineko Elena V, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Plant Bioengineering, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation; Professor, Department of Plant Physiology & Biotechnology, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Pr., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Shchelkunov Sergei N, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Pathological Processes, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation; Professor, Chair of Molecular Biology, Novosibirsk State University, 2 Pirogova Str., Novosibirsk, 630090.

E-mail: snschel@rambler.ru