

**Р.А. Карначук, В.Ю. Дорофеев, Е.С. Гвоздева, Ю.В. Медведева,
М.В. Ефимова, А.А. Чуринов, Л.Б. Глухова**

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ТРАНСГЕННОГО ТАБАКА С ГЕНОМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-18 ЧЕЛОВЕКА КАК ПРОДУЦЕНТА БЕЛКОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

*Впервые получены каллусные и суспензионные культуры *in vitro* трансгенных растений табака с геном интерлейкина-18 человека линий IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3, а также родительская линия SR1. Оптимизирована питательная среда, включающая гормоны 2,4-Д и БАП для культивирования этих линий. Установлены время удвоения клеток в трансгенных линиях табака и продолжительность культивирования клеток в суспензиях. Показано, что полученные суспензионные и каллусные культуры трансгенных линий табака IL18№7-1 и IL18№7-11 наиболее активно продуцируют белок интерлейкин-18 человека.*

Существует несколько путей получения ценного и дефицитного лекарственного сырья: дикорастущие растения, интродукция и создание искусственных растительных плантаций; метод культуры тканей и клеток лекарственных растений *in vitro*. Технология *in vitro* позволяет получать экологически чистое сырье круглый год, независимо от климатических условий и трудностей сбора сырья, увеличивать выход биологически активных веществ, регулируя их накопление в культуре. Так, успешно культивируются в качестве источника алкалоидов *Atropa belladonna* L., *Symphytum officinale*, *Aconitum* sp.; алкалоидов и сапонинов – *Nigella* sp.; витамина E – *Carthamus tinctorius* L.; эфирных масел – *Lavandula* sp. и многие другие растения [1, 2]. Данный метод имеет ряд преимуществ перед использованием интактного растения. Он позволяет получать сырье независимо от климатических условий и трудностей сбора, дает возможность поддерживать рост растений круглый год, что важно для растений, имеющих в цикле своего развития периоды покоя.

На основе изучения биосинтетических процессов можно получить наиболее богатые тканевые клоны биологически действующих веществ, а также заменить интактные растения, природный ареал которых недостаточен для использования в практических целях.

Генетическая инженерия позволила создать новые растения, белковые продукты которых важны для терапии различных заболеваний. Гены терапевтически важных белков человека и животных можно вводить в различные системы экспрессии, но каждая из них имеет свои достоинства и недостатки. Идеальной является система экспрессии, которая наиболее безопасна и обеспечивает продукцию биологически активного продукта по минимальной цене. Использование цитокинов в качестве лекарственных препаратов также ограничено тем фактом, что их выделение из традиционных источников является трудоемким процессом. Наиболее перспективными являются растения.

Новейший подход к созданию вакцин состоит в получении трансгенных растений, продуцирующих антигенные белки инфекционных агентов, и ис-

пользовании их в качестве съедобных вакцин. Стенки клеток растений обеспечивают эффективную защиту находящегося в них антигена в ротовой полости и желудке, содержимое которого имеет кислую реакцию. Поэтому упакованный таким образом антиген эффективно достигает кишечника, где индуцирует иммунный ответ на уровне слизистых оболочек. Важной особенностью съедобных вакцин является их потенциальная дешевизна, биологическая безопасность, простота хранения и применения.

В институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) получены трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) линий IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 с экспрессируемым геном интерлейкина IL-18. Содержание рекомбинантного белка в тканях растений составило более 0,01% от общего растворимого белка, что в пересчете на сырую массу растения – 1,3 мг/кг.

Цель нашей работы заключалась в том чтобы получить каллусную и суспензионную культуры *in vitro* трансгенных линий табака (*Nicotiana tabacum* L.) IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3, оптимизировать питательные среды для их культивирования и проанализировать содержание интерлейкина-18 (ИЛ-18) человека в полученных культурах. Предпосылкой данных исследований стала работа по введению в культуру *in vitro* шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) в качестве продуцента биологически активных веществ, в том числе флавоноидов. В дальнейшем предполагалось получить клеточные культуры табака с геном ИЛ-18 человека на основе различных эксплантов и нескольких линий трансгенных растений табака. Для этого было необходимо: оптимизировать питательные среды и концентрации их компонентов для получения быстрорастущих каллусных культур; получить суспензионные культуры трансгенных линий табака IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3, продуцирующие ИЛ-18 человека; провести анализ количественного определения ИЛ-18 человека в каллусных и суспензионных культурах трансгенных линий табака IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3.

Объекты и методики исследования

Объектами исследований явились линии трансгенных растений табака IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3, представляющие собой потомство от самоопыления (T1) двух исходных линий трансгенных растений табака IL18№7 и IL18№28. Растения ранее получены Е.В. Дейнеко с сотрудниками (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск) методом агробактериального переноса генетической конструкции с целевым геном ИЛ-18 человека в плазмиде pBilO1-IL18. В состав конструкции для экспрессии целевого гена в растительных клетках включены репортерный ген *uidA*, маркерный ген *np11l*, обеспечивающий устойчивость растительных клеток к антибиотику канамицину и 35S-промотор гена вируса мозаики цветной капусты, права на использование которых принадлежат американской фирме «Монсанто». Права на использование рекомбинантной плазмидной ДНК pBin101-IL18, кодирующей синтез ИЛ-18 человека в трансгенных растениях, принадлежат Институту цитологии и генетики СО РАН, Институту биологической химии и фундаментальной

медицины СО РАН и Институту клинической иммунологии СО РАМН (Патент РФ № 20051133963 от 17 января 2007 г.).

Использование в качестве объектов трансгенных линий табака для выполнения исследований определено в Договоре о сотрудничестве между Томским госуниверситетом и ИЦиГ СО РАН от 20.01.2006 г.

Выращивание растений табака и получение семян. Для посадки семян растений табака второго поколения использовали универсальный почвогрунт Terravita. Почву, предварительно просеянную через сито и увлажненную, а также керамзит пропаривали в течение одного часа в сушильном шкафу при температуре 120°C.

Для посадки использовали небольшие сосуды (200 мл), а затем, по мере роста растения пересаживали в сосуды большего объема до 2 л. Сосуды с семенами выставляли на белый свет под люминесцентные лампы фирмы Philips TL-D 36 W/54-765. Интенсивность света составляла 5000 лк. Для подкормки использовали водорастворимое удобрение «Кемира Люкс для овощей, цветов и рассады» 1 раз в неделю. Через 6 месяцев от растений табака второго поколения были получены семена.

Получение стерильных растений табака in vitro проводилось в асептических условиях. Среда и фильтры стерилизовали автоклавированием в режиме 0,7–0,8 атм. в течение 30 мин. Была использована агаризованная безгормо-нальная питательная среда МС [3].

Для выращивания проростков табака подготавливали специальные контейнеры, в которые разливали стерильную среду. Стерилизации семян проводилась в чашках Петри, на дно которых укладывали стерильные фильтры, смоченные стерилизующим раствором: 96%-ный этанол, стерильная дистиллированная вода и 37%-ная перекись водорода (30 : 4 : 4). Семена помещали на смоченный фильтр. Открытые чашки Петри оставляли под УФ-излучением на 10 мин. Затем семена стряхивали с подсохшего фильтра в подготовленные контейнеры на застывшую питательную среду. Контейнеры закрывали парафилмом и помещали в культуральную комнату на белый свет под люминесцентные лампы фирмы Philips TL-D 36 W/54-765 (I = 1000 лк, фотопериод 16/8 (день/ночь), t = 25–27°C, влажность – 70%).

Спустя 5 недель листья 3-го яруса стерильных растений табака использовали с целью получения эксплантов для индукции каллусообразования.

Индукция каллусообразования. В условиях ламинар-бокса растения табака извлекали пинцетом из контейнеров и рассекали листья на небольшие сегменты площадью 1×0,5 см². Экспланты помещали в пробирки на агаризованную питательную среду МС.

Для индукции каллусогенеза питательные среды МС модифицировали различными стимуляторами роста: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д), α-нафтилуксусной кислотой (НУК), кинетином, 6-бензиламинопурином (БАП), а также добавляли мио-инозитол в концентрации 100 мг/л и гидролизат казеина – 300 мг/л.

Пробирки закрывали фольгой и парафилмом и помещали в культуральные установки в темноту (t = 27–30°C, влажность – 70%).

Получение суспензионных культур. Переход к периодическому культивированию (суспензионным культурам) в первую очередь был вызван тем, что при таком режиме культивирования, как правило, происходит интенсификация ростовых процессов, а в ряде случаев увеличивается биосинтетический потенциал культур. Суспензионные культуры сохраняют ряд свойств, характерных для исходного организма. Одним из таких свойств является способность к синтезу вторичных метаболитов [4, 5]. Быстрое получение биомассы растительных клеток суспензионных культур позволяет использовать крупномасштабное промышленное оборудование (ферментеры) для культивирования.

Материалом для исследования являлась культура клеток трансгенных растений табака. Перед введением в суспензию, каллусную культуру выращивали на агаризованной среде МС с добавлением витаминов (тиамин-НС1, пиридоксин-НС1, никотиновая кислота-НС1), 30 г/л сахарозы, 8 г/л агара; рН среды 5,8. Для оптимизации роста и получения рыхлой биомассы добавляли фитогормоны 2,4-Д и БАП в определенных концентрациях. После ряда пересадок на данную среду каллус становился более рыхлым. Культуру клеток, выращенную на среде с 2,4-Д, имеющую рыхлую структуру и достаточно высокую интенсивность роста, использовали для получения суспензии клеток.

Имуноферментный метод количественного определения интерлейкина-18 человека в клеточных культурах трансгенных линий табака. Количественное определение ИЛ-18 человека в культурах трансгенных линий П18№7-1, П18№7-11 и П18№28-3 *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* было проведено с помощью современного метода анализа – иммуноферментного, адаптированного к измерению титра изучаемого протеина в питательной культуральной среде, либо в гомогенате культивируемых растительных клеток.

Результаты и обсуждение

Первоначально определялась эффективность каллусообразования на средах, основу которых составляла МС, а в качестве гормонов использовались НУК, 2,4-Д и БАП. Начало индукции каллуса на эксплантах листьев табака наблюдалось через 5–7 дней от начала культивирования. Наиболее интенсивное образование и рост каллуса происходило через 2–3 недели. Цвет каллуса изменялся от светлого до бело-желтого. Каллусообразование наблюдалось на всех исследованных средах (рис. 1). Оптимизировали сочетание стимуляторов роста для индукции каллусогенеза у табака как дикой линии SR1, так и трансгенных линий на средах, содержащих НУК, в ряде случаев наблюдался органогенез.

Через 30 суток культивирования образованный каллус отделяли от эксплантов и помещали на свежую среду для субкультивирования.

Для дальнейшего выращивания использовали среды с 2, 4-Д, дополненные кинетином или БАП в определенной концентрации. Как и в случае с индукцией первичного каллуса, рост каллуса 1-го субкультивирования был интенсивнее на средах, дополненных цитокининами.

Показано, что оптимальным сочетанием стимуляторов роста для индукции каллусогенеза у табака как дикой линии SR1, так и трансгенных линий 2,

4-Д и БАП. Наблюдался активный рост каллусной ткани как исходной родительской, так и всех трансгенных линий на протяжении 2-го и 3-го субкультивирований.

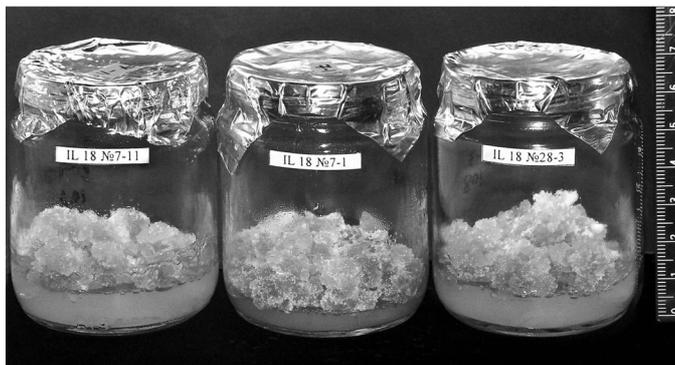


Рис. 1. Каллусные культуры *Nicotiana tabacum* L. трансгенных линий IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№ 28-3 3-го субкультивирования на средах МС с добавлением гормонов 2,4-Д и БАП

Исследование ростовых параметров каллусных клеток табака in vitro. Выявлены значительные морфометрические отличия между исходной и трансгенными линиями. Так, по сравнению с родительской линией SR1, которая была представлена клетками правильной округлой или овальной формы, трансгенная линия IL18№7-1 преимущественно состояла из сильно вытянутых в длину клеток, объем которых был больше растительных в 1,5–2 раза. Клетки трансгенной линии IL18№7-11 имели округлую форму, объем которых в 6–10 раз меньше, чем у исходной линии SR1. Прирост сухой биомассы каллуса всех линий табака выражался типичной S-образной кривой. Следует отметить, что каллус родительской линии SR1 достигал максимального веса на 20-е сутки, после чего рост замедлялся, тогда как для трансгенной линии IL18№7-1 это происходило на 10-е сутки, а для IL18№7-11 на 20–25-е сутки (рис. 2 и 3).

Кривые роста клеток в суспензионной культуре генмодифицированных линий табака. При получении и культивировании суспензии по описанным выше методикам, в культуре с первых суток начиналось формирование агрегированных структур. Количество клеток в таких структурах от 10 до 30, в зависимости от возраста культуры и условий культивирования. Исследование ростовых характеристик суспензионной культуры клеток первого субкультивирования, продолжавшегося короткий отрезок времени, показало наибольшее накопление биомассы на 5-е сутки субкультивирования для линий SR1, IL18№7-1 и IL18№7-11. Жизнеспособность клеток составляла 76–80%. Подобный результат получен в работе с суспензионной культурой живучки ползучей (*Ajuga reptans* L.), которая при культивировании показала высокую жизнеспособность (до 89%), некротические процессы незначительны и сохраняются на одном уровне в течение всего пассажа [6]. При втором субкуль-

тивировании в жидкой среде была получена культура с такими же ростовыми характеристиками. Наблюдение за ростом клеточной суспензии 3-го субкультивирования было продолжено до 20 суток. Третье и последующие субкультивирования суспензионных культур трансгенных линий растений табака проводили в конических плоскодонных колбах объемом 250 мл. Оказалось, что нарастание биомассы клеток идет интенсивно до 16 суток, после чего кривая роста выходит на плато. При третьем субкультивировании удвоение клеточной биомассы трансгенной линии IL18№7-11 происходило на 6-е сутки, тогда как количество клеток линий IL18№7-1, SR1 и IL18№28-3 удвоилось на 7–8-е сутки субкультивирования (рис. 4). Микроскопирование клеток суспензионных культур 4-го субкультивирования показало, что для клеток всех линий табака характерно содержание крупных вакуолей. В основном размер таких вакуолизированных клеток был в пределах 40–70 мкм (78%), но встречались и более крупные – до 100–130 мкм (10%).

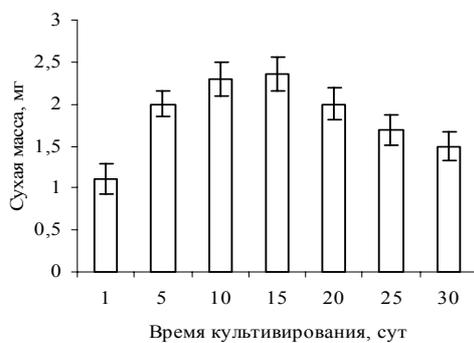


Рис. 2. Прирост биомассы каллусной культуры табака линии IL18№7-1, выращиваемой в темноте, 2-е субкультивирование

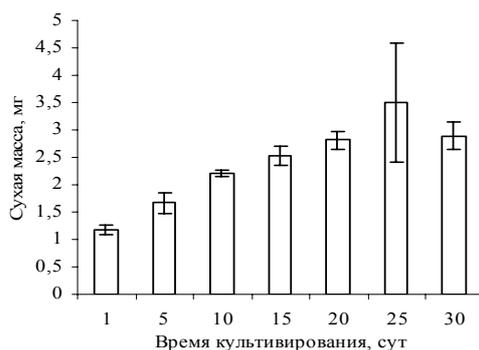


Рис. 3. Прирост биомассы каллусной культуры табака линии IL18№7-11, выращиваемой в темноте, 2-е субкультивирование

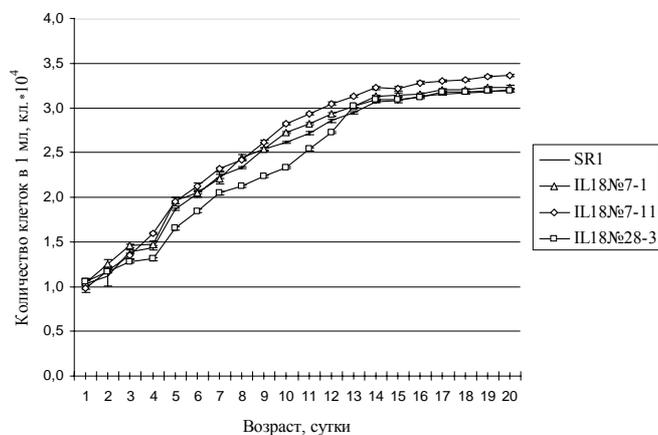


Рис. 4. Кривая роста суспензионной культуры исходной SR1 и трансгенных IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 линий *Nicotiana tabacum* L. 3-го субкультивирования

Анализировали морфометрические показатели клеток в суспензионной культуре. Это, в основном, паренхимные клетки округлой, овальной, вытянутой формы и элементов вторичной дифференциации в виде трахеид, доля которых уменьшалась в последующих пассажах и составляла, в зависимости от возраста субкультуры, от 10 до 20%. Встречались и довольно крупные клетки (рис. 5).

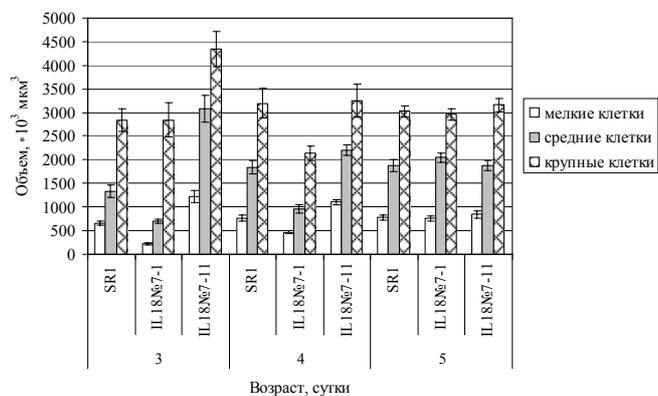


Рис. 5. Объемы клеток суспензионной культуры исходной SR1 и трансгенных IL18№7-1 и IL18№7-11 линий *Nicotiana tabacum* L. 4-го субкультивирования, $\times 10^3 \mu\text{m}^3$

Можно отметить, что морфология клеток в процессе культивирования постепенно изменялась. Через пять суток размеры клеток трансгенных линий становились равными с соответствующими клетками родительской линии.

Наблюдали сходство в особенностях роста и морфологии клеток суспензии трансгенных линий растений табака IL18№7-1 и IL18№7-11. У этих линий клетки в суспензии приобретали более вытянутую форму, часто отдельные клетки выстраивались в цепочку.

После 15–16 суток культивирования суспензионных культур трансгенных линий IL18№7-1 и IL18№7-11 табака наблюдался процесс агрегации клеток. Количество клеток в таких конгломератах увеличивалось со временем культивирования и составляло более 30. Эти клеточные структуры состояли из довольно мелких клеток округлой формы.

В цикле 4-го субкультивирования наблюдали отличие в кривой роста клеток трансгенных линий IL18№7-1 и IL18№7-11, которые росли активнее линий IL18№28-3 и SR1.

Микроскопический анализ суспензионной культуры трансгенной линии IL18№28-3 табака показал наличие клеток округлой формы, основная масса которых отличалась вакуолизированностью. Аналогичные по морфологии клетки наблюдались и в суспензии родительской линии SR1.

При 5-м субкультивировании отчетливо наблюдалась интенсификация ростовых процессов у клеточных культур линий IL18№7-1 и IL18№7-11, тогда как интенсивность роста у линии IL18№28-3 оставалась неизменной в сравнении с предыдущими субкультивированиями. В этом цикле культивирования удвоение биомассы клеток линии IL18№7-11 происходило на двое суток раньше по сравнению с таковым предыдущих субкультивирований. Линия IL18№28-3 отставала в росте.

6-е субкультивирование активно растущих линий IL18№7-1 и IL18№7-11 проводили на шейкере и в биореакторе. Во всех вариантах выращивания наблюдали ростовую активность клеток суспензии трансгенной линии IL18№7-1, количество которых удвоилось на 4–5-е сутки субкультивирования (рис. 6 и 7).

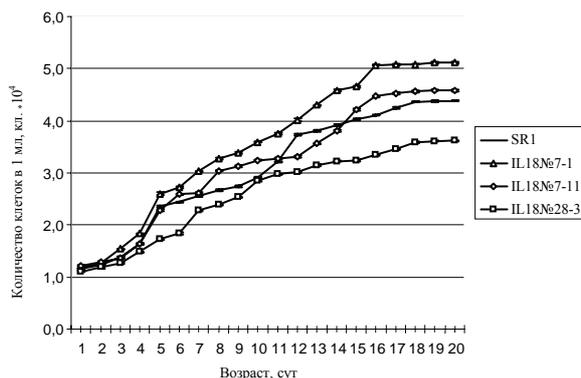


Рис. 6. Кривая роста суспензионной культуры исходной SR1 и трансгенных IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 линий *Nicotiana tabacum* L. 6-го субкультивирования

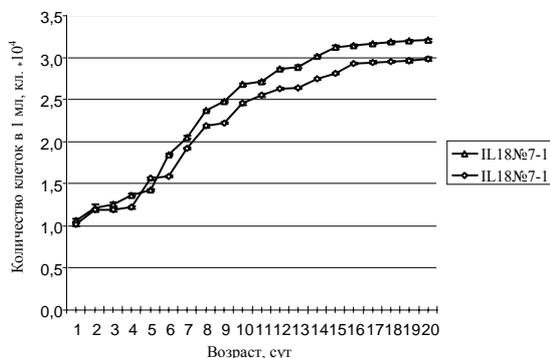


Рис. 7. Кривая роста суспензионной культуры исходной SR1 и трансгенных IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 линий *Nicotiana tabacum* L. 6-го субкультивирования в биореакторе

Таким образом, впервые получены суспензионные культуры трансгенных IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 линий табака; изучены ростовые и морфометрические характеристики их клеток. Выявлена ростовая активность трансгенных линий IL18№7-1 и IL18№7-11 табака. Получены ростовые кривые 5 циклов суспензионных культур, культивируемых на шейкере, и 6-го субкультивирования в биореакторе, что делает возможным в дальнейшем произвести масштабирование для промышленного культивирования. Проведен иммуноферментный анализ на содержание ИЛ-18 человека в образцах культивируемых клеточных суспензий трансгенных линий IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 *Nicotiana tabacum* L. разного возраста, в которых обнаружено активное накопление целевого продукта – белка гена ИЛ-18 человека.

Содержание интерлейкина-18 в трансгенных линиях каллусной и суспензионной культурах табака. С помощью метода иммуноферментного анализа было проведено количественное измерение ИЛ-18 для каллусной культуры третьего субкультивирования и показано наличие этого белка (табл. 1). Следует отметить одинаковый уровень ИЛ-18 в трех трансгенных линиях. Последующие анализы проведены для клеток суспензионной культуры 4-го субкультивирования (табл. 2). Отсутствие белка в питательной среде говорит о том, что пептид сохраняется в клетке и не поступает в питательную среду. Незначительное показание протеина в гомогенате клеток дикой линии SR1 может быть обусловлено неспецифическим реагированием белковых компонентов клетки с моноклональными антителами к ИЛ-18 при постановке реакции иммуноферментного анализа. Наиболее активное накопление ИЛ-18 происходило в культуре клеток линии IL18№7-1 уже на 5-е и продолжавшееся на 20-е сутки культивирования (табл. 2). Так как средняя концентрация ИЛ-18 в сыворотке крови условно здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири составляет 364 пг/мл (в диапазо-

не 104–640 пг/мл, по данным фирмы-изготовителя набора реагентов «Вектор-Бест»), то полученный титр цитокина в линиях IL18№7-1 (5-е сутки) и IL18№7-1 (20-е сутки) значительно превышал физиологический уровень интерлейкина в сыворотке крови условно здоровых людей. Рост концентрации ИЛ-18 был зафиксирован и у других линий трансгенных клеток табака, но в гомогенате линии IL18№7-11 после 20 суток культивирования эти различия были не достоверны из-за большой вариабельности результатов измерения соответствующих образцов.

Таблица 1

**Содержание ИЛ-18 в трансгенных клетках
каллусной культуры табака 3-го субкультивирования**

Линии	Содержание ИЛ-18, пг/мл
IL18№7-1	1087,96±1,99
IL18№7-11	1096,81±2,43
IL18№28-3	1083,59±2,49

Таблица 2

**Содержание ИЛ-18 в линиях трансгенных клеток табака
суспензионной культуры на 5-е и 20-е сутки культивирования
4-го субкультивирования**

Линии		Содержание ИЛ-18, пг/мл	
		Питательная среда	Гомогенат
Контроль питательной среды		4,9	–
5-е сутки	SR1	0,00±0,00	8,05±1,09
	IL18№7-1	1,42±0,73	785,98±174,65
	IL18№7-11	0,00±0,00	85,30±11,88
	IL18№28-3	0,00±0,00	17,80±2,89
20-е сутки	SR1	12,47±1,77	21,15±3,34
	IL18№7-1	34,43±11,91	1094,02±9,10
	IL18№7-11	0,65±0,32	66,95±23,06
	IL18№28-3	0,93±0,35	82,35±27,14

На следующем этапе исследований было проведено измерение концентрации ИЛ-18 в суспензионной культуре трансгенных клеток табака после 5-го субкультивирования, а также в линиях, выращенных в биореакторе. У всех исследованных линий трансгенного табака были зафиксированы высокие титры ИЛ-18 (табл. 3). При этом концентрация ИЛ-18 в гомогенатах клеток, культивированных в биореакторе, было ниже значений изучаемого цитокина в соответствующих линиях трансгенных клеток, выращенных в суспензионной культуре на шейкере.

При измерении титра ИЛ-18 в каллусной культуре клеток табака *Nicotiana tabacum* была выявлена высокая концентрация изучаемого цитокина (табл. 3).

Таким образом, получены трансгенные линии IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 *Nicotiana tabacum* L. каллусных и суспензионных клеточных культур, продуцирующих иммунный белок человека ИЛ-18.

Таблица 3

**Содержание ИЛ-18 в трансгенных клетках
суспензионной культуры табака 6-го субкультивирования**

	Линии	Содержание ИЛ-18, пг/мл
Шейкер	IL18№7-1	2183,33±4,31
	IL18№7-11	2189,10±4,54
	IL18№28-3	1093,60±2,02
Биореактор	IL18№7-1	1049,69±207,07
	IL18№7-11	1006,73±168,63

Наибольшее содержание этого цитокина показано для клеток линий IL18№7-1 и IL18№7-11 трансгенного *Nicotiana tabacum* L. в суспензии в возрасте 20 суток 6-го субкультивирования на шейкере. Результаты исследования дают основание для использования полученных суспензионных культур линий трансгенного табака в опытно-производственном масштабе для получения иммунного белка интерлейкина-18 человека.

Заключение

Впервые получены каллусные культуры *in vitro* трансгенных растений табака с геном ИЛ-18 человека линий IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3, а также родительская линия SR1. Оптимизирована питательная среда, включающая гормоны 2,4-Д и БАП для культивирования этих линий. Впервые получены суспензионные культуры трансгенных линий табака IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 и изучены ростовые и морфометрические характеристики клеток. Выявлена ростовая активность клеток трансгенных линий IL18№7-1 и IL18№7-11. Получены ростовые кривые 5 субкультивирований суспензионных культур IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3, культивируемых на шейкере и линий IL18№7-1 и IL18№7-11 6-го субкультивирования в биореакторе.

Проведен иммуноферментный анализ образцов каллусных и суспензионных культур трансгенных линий IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 *Nicotiana tabacum* L. разного возраста на содержание ИЛ-18, в которых обнаружено активное накопление целевого продукта – интерлейкина-18 человека. Наиболее активное накопление ИЛ-18 происходило в суспензионной культуре клеток линии IL18№7-1 уже на 5-е сутки культивирования.

Было проведено исследование содержания ИЛ-18 в суспензионной культуре трансгенных клеток табака линий IL18№7-1, IL18№7-11 и IL18№28-3 после 5-го субкультивирования, а также в линиях, выращенных в биореакторе IL18№7-1 и IL18№7-11.

У всех исследованных линий трансгенного табака были зафиксированы высокие титры ИЛ-18. При этом концентрация ИЛ-18 в гомогенатах клеток, культивированных в биореакторе, была ниже значений изучаемого цитокина в соответствующих штаммах трансгенных клеток, выращенных в суспензионной культуре на шейкере.

Проведен патентный поиск и подана заявка на «Способ культивирования *in vitro* клеточной культуры трансгенного табака (*Nicotiana tabacum L.*), содержащего ген интерлейкина-18 человека» (Регистрационный номер уведомления о поступлении и регистрации заявки № 2007123878 от 25.06.2007 г.).

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП (Государственный контракт от 27 февраля 2007 г. № 02.512.11.2035) на базе кафедры физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета.

Литература

1. Shoyama Y., Nishioka I., Hatano K. IV. Aconitum spp. (Monkshood) // Biotechnology in Agriculture and Forestry 15. Medicinal and Aromatic Plants III / Ed. by Y.P.S. Bajaj. With 208 Figures. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991. P. 68–73.
2. Schmauder H.-P., Doebel P. XIX *Nigella* spp.: *in vitro* culture, regeneration and the formation of secondary metabolites // Biotechnology in Agriculture and Forestry 15. Medicinal and Aromatic Plants III / Ed. by Y.P.S. Bajaj. With 208 Figures. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991. P. 311–336.
3. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, № 13. P. 473–497.
4. Simmonds M.S.J. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge // *Phytochemistry*. 2003. Vol. 64. P. 21–30.
5. Seo W.-T., Park Y.-H., Choe T.-B. An optimization of flavonoid production from the suspension culture of *S. baicalensis* cells // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1996. Vol. 6, № 5. P. 347–351.
6. Запрометов М.Н. Вторичный метаболизм в культурах клеток и тканей растений: Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С. 37–51.