

УДК 57.083.2./3:575:582.926.2:619:616.98

ОДЕРЖАННЯ АНТИГЕНУ VP7 ВІРУСУ БЛЮТАНГУ ЖУЙНИХ У ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ *Nicotiana tabacum*

В. Г. Спиридонов
К. С. Ситник
М. Ф. Парій
Н. В. Павлюченко
Д. Ю. Рибальченко
Д. Л. Мартиненко
М. Д. Мельничук

Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК,
Національний університет біоресурсів і природокористування
України

E-mail: spyrydonov@ukr.net

Розроблено метод одержання імунологічно активного групоспецифічного антигену VP7 вірусу блютангу жуйних у трансгенних рослинах *Nicotiana tabacum*. Селективним схрещуванням отримано гомозиготні лінії трансгенного тютюну з максимальним рівнем експресії рекомбінантного антигену VP7. Показано, що сумарний вихід очищеного антигену становить 0,2 мг на 1 г рослинної біомаси. Одержаний рекомбінантний антиген VP7 може бути використано у ветеринарній практиці для створення вітчизняних ІЕА-діагностикумів для серологічного моніторингу та запобігання розповсюдженню блютангу територією України.

Ключові слова: блютанг жуйних, трансгенні рослини, рекомбінантні антигени, імуноензимний аналіз.

Блютанг, або катаральна лихоманка овець — вірусне інфекційне захворювання диких та домашніх жуйних, що передається кровосисними комахами роду *Culicoides* (рис. 1). Блютанг уперше описано в XIX ст. в овець у Південній Африці. Упродовж XX ст. блютанг широко розповсюдився в країнах тропічних та субтропічних регіонів і займає географічний ареал між широтами 40° на північ та 35° на південь. Однак в останні роки у зв'язку з глобальним потеплінням ареал розповсюдження блютангу розширився на північ (перетнув 50° паралель північної широти), спалахи блютангу фіксуються і в країнах Східної Європи (рис. 2) [1].



Рис. 1. Мошка з роду *Culicoides* — переносник вірусу блютангу
(<http://www.bluetonguevirus.org>)

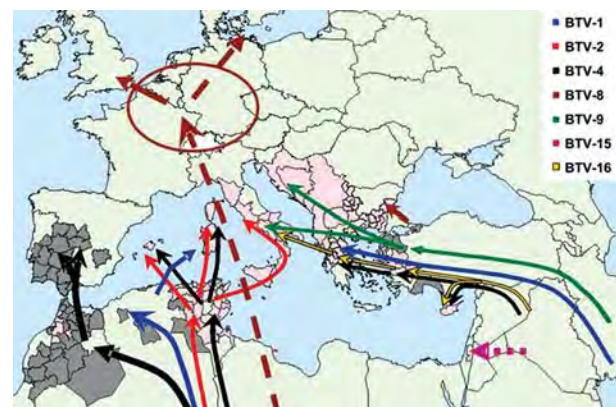


Рис. 2. Епідеміологія вірусу блютангу (BTV) в Європі з 1998 р.: шляхи інтродукції різних серотипів вірусу
(<http://www.cdc.gov/EID/content/14/4/539-G1.htm>)

Клінічні ознаки захворювання виявляються переважно в овець у вигляді гарячкової реакції, що характеризується запаленням носової оболонки, набряками й крововиливами слизової рота та язика. У тяжких випадках язик враженої тварини синіє внаслідок інтенсивної гіперемії, набрякає та стирчить з рота. Смертність у таких випадках може сягати 75%. У великої рогатої худоби клінічні симптоми блютангу рідко мають виразний характер і через латентний

перебіг інфекції тварини стають джерелом та резервуаром для накопичення й розповсюдження вірусу блютангу [1].

Враховуючи летальний перебіг інфекції, Міжнародне епізоотичне бюро (МЕБ) включило блютанг до списку А (потенційно небезпечних інфекцій, що мають економічний вплив), що передбачає постійний моніторинг за розповсюдженням інфекції, особливо під час переміщення тварин у міжнародній торгівлі. Раннє виявлення заражених тварин та їх видалення може значно зменшити наслідки хвороби за рахунок зниження вірусного навантаження, а також стримування поширення хвороби через експортування потенційно інфікованих тварин. Останнє є дуже серйозною проблемою, адже перебіг інфекції без будь-яких виявів клінічних ознак у великій рогатій худоби може тривати до 100 днів [2].

Для моніторингу та контролю за розповсюдженням блютангу використовують серологічні методи діагностики, оскільки вірусоспецифічні антитіла з'являються вже через 7–14 днів після зараження і, як правило, зберігаються довго. Основними серологічними методами діагностики блютангу, рекомендованими МЕБ, є реакція імунодифузії в агарі (РІД) та імуноензимний аналіз (ІЕА) [3, 4].

Метою нашої роботи було розробити біотехнологічний метод одержання вірусоспецифічного антигену VP7 вірусу блютангу в трансгенних рослинах *Nicotiana tabacum* та оцінити його діагностичний потенціал під час проведення ІЕА з референс-зразками інфікованої вірусом блютангу крові овець.

Матеріали і методи

Конструювання плазмід та трансформацію бактеріальних штамів проводили згідно зі стандартними протоколами [5]. У роботі використовували вихідні плазмід ImpactVector 1.1-tag, pBINPlus (Plant

Research International of Wageningen University) та бактеріальні штами *Escherichia coli* XL-1blue, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Ген, що кодує антиген VP7 вірусу блютангу (серотип 8), виділяли зі зразка крові інфікованої вівці (38 д. п. і.) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за участю специфічних праймерів VP7-F та VP7-R (табл. 1). Продукт ПЛР розміром 1043 п. н., обробляли ендонуклеазами рестрикції *NcoI* та *NotI*, після чого клонували у підготовлений відповідним чином вектор ImpactVector 1.1-tag. Факт вдалого клонування підтверджували рестрикційним аналізом, ПЛР та визначенням нуклеотидної послідовності (секвенуванням) клонованого фрагмента за участю відповідних праймерів IV-P та IV-T (табл. 1).

Транскрипційну касету, що складається з гена VP7, під контролем промотору та термінатора транскрипції гена *RbcS1* у складі ImpactVector 1.1-tag ампліфікували в ПЛР з використанням пари праймерів BIN-F та BIN-R (табл. 1). Продукт ПЛР розміром 3166 п. н. обробляли ендонуклеазами рестрикції *SalI* та *EcoRI*, після чого клонували у підготовлений відповідним чином вектор pBINPlus. Факт успішного клонування підтверджували рестрикційним аналізом, ПЛР та визначенням нуклеотидної послідовності (секвенуванням) клонованого фрагмента. Одержана генетична конструкція, призначена для трансформації агробактерії, отримала назву pBIN-BTV.

Генетичну трансформацію тютюну здійснювали спільним культивуванням експлантів листків асептичних рослин тютюну *Nicotiana tabacum* сорту Petit Gavana з нічною культурою агробактерії (OD₆₀₀ 3,0), що містила вектор pBIN-BTV. Для трансформації використовували листки віком 3–4 тижні, які нарізали квадратами близько 5×5 мм, переносили до суспензії агробактерії в середовищі MS та витримували протягом 20 хв.

Таблиця 1. Використані олігонуклеотидні праймери для ПЛР

Назва	Нуклеотидна послідовність, 5'–3'	Розмір продукту ПЛР, п. н.	Призначення
VP7-F	atgccccatggacactatcgtgcaag	1043	Виділення та клонування гена VP7 в ImpactVector за участю рестрикційних сайтів <i>NcoI</i> та <i>NotI</i>
VP7-R	atgcgcgccgccacatagggcgcgcg		
BIN-F	atgcgctgactgtggaattgtgagcg	3166	Клонування транскрипційної касети гена VP7 в pBINPlus за участю рестрикційних сайтів <i>SalI</i> та <i>EcoRI</i>
BIN-R	atgccaattcgttttccagtcacgc		
IV-P	aatggccacaggaacgtaag	1445	Визначення нуклеотидної послідовності гена VP7 у складі ImpactVector
IV-T	ccggaacaacaacgaaat		

Експланти вміщували на стерильний фільтрувальний папір для видалення надмірної кількості агробактеріальної суспензії і переносили на живильне середовище MS з додаванням рослинних регуляторів росту БАП у концентрації 1,0 мг/л та НОК — 0,1 мг/л, де протягом 2–3 днів відбувалася подальша культивування. Після культивування експланти відмивали від агробактерії в стерильній дистильованій воді, підсушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на селективно-регенеративне середовище MS, доповнене БАП (1,0 мг/л), НОК (0,1 мг/л), антибіотиком цефотаксимом у концентрації 1 000 мг/л для пригнічення росту бактерій та селективним агентом для трансгена — канаміцином (50 мг/л) [6, 7]. Культивування на цьому середовищі продовжували до появи регенерантів. Експланти регулярно, з періодичністю 2–3 тижні, пересаджували на свіже живильне середовище. При кожному наступному пасажі залежно від інтенсивності росту *A. tumefaciens* знижували концентрацію цефотаксиму в середовищі. Через 6–9 тижнів спостерігали утворення регенерантів. Сформовані пагони для вкорінення переносили на агаризоване середовище MS, доповнене канаміцином (50 мг/л). Рослини-регенеранти з потужною кореневою системою висаджували в ґрунт. Перед висадкою проводили адаптацію рослин до умов вирощування в ґрунті, попередньо стерилізованому автоклавуванням протягом 20 хв за тиску 1 атм.

Визначення кількості копій трансгена здійснювали, аналізуючи розщеплення в першому (T1) та другому (T2) поколіннях. Відповідність фактичного розщеплення теоретично очікуваному оцінювали з використанням критерію Пірсона χ^2 [8].

Виділення рекомбінантного антигену VP7 вірусу блютангу з біомаси трансгенних рослин тютюну проводили таким чином: вегетативну масу подрібнювали в блендері до гомогенного стану з додаванням буфера (ФСБ, рН 7,2, 2,0% ПВП-30000, 0,05% твін-20) у співвідношенні 1:3. Гомогенат віджимали крізь щільну бавовняну тканину і фільтрат центрифугували при 10 тис. г протягом 20 хв. Супернатант наносили на афінну колонку з Ni-NTA-агарозою (Qiagen) та здійснювали очищення цільового протеїну в нативних умовах відповідно до рекомендацій виробника. Контроль за якістю та чистотою отриманого протеїну проводили методом електрофорезу в 12%-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ПААГ-ДСН).

Імунологічну активність рекомбінантного антигену VP7 вірусу блютангу перевіряли методом непрямого ІЕА з референсними та польовими сироватками інфікованих на блютанг овець, люб'язно наданих д-ром Берндом з Інституту Леффлера (Friedrich Loeffler Institute, Німеччина). Антиген адсорбували на планшетах в концентрації 10 мкг/мл в карбонат-бікарбонатному буфері (0,05M, рН 9,6). Сироватки та зразки крові використовували в розведенні 1:20 і аналізували в трьох повторах. Специфічно зв'язані антитіла виявляли за допомогою імуноензимного кон'югату протеїну G з пероксидазою хрому [9]. Пероксидазну активність виявляли за допомогою хромогенного субстрату ТМВ, реакцію зупиняли через 20 хв 0,5 M сірчаною кислотою і вимірювали оптичну густину продуктів ІЕА в спектрофотометрі за довжини хвилі 450 нм.

Результати та обговорення

Вірус блютангу (BTV) — це групоспецифічний вірус роду *Orbivirus* родини *Reoviridae*, що включає 24 різних серотипи BTV 1-24. До роду *Orbivirus* також належать відмінні серогрупи вірусів епізоотичної геморагічної хвороби диких жуйних (8 серотипів) та африканської хвороби коней (9 серотипів). Вірус блютангу має невеликий (90 нм у діаметрі) ікосаедральний капсид, що містить сегментований геном з 10 сегментів дволанцюгової РНК (рис. 3). Кожен із сегментів кодує різні вірусні протеїни. Виділяють 7 структурних компонентів вірусного капсиду (VP1-7) та 3 неструктурних (NS1-3). Внутрішній шар капсиду складається з 5 структурних протеїнів: 3 мінорних (VP1, VP4, VP6) та 2 мажорних (VP3, VP7), зовнішній шар — з 2 мажорних вірусних протеїнів (VP2, VP5). Причому, саме антиген VP2 зумовлює серотипову різноманітність вірусу блютангу, а VP7 — серогрупову специфічність [1, 2]. Виходячи з цього VP7 було обрано як антиген для серологічної діагностики блютангу.

Ми клонували кДНК сегмента 7 вірусу блютангу, що кодує групоспецифічний антиген VP7, в ImpactVector 1.1-tag під контроль промотору та термінатора транскрипції гена РУБІСКО (рибулозобіфосфаткарбоксилаза) з *Asteraceous chrysanthemum*. Таку систему регуляції транскрипції трансгена обрали тому, що промотор РУБІСКО у 8 разів сильніший за звичайний промотор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти і забезпечує накопичення гетерогенного продукту в зеленій біомасі рослини більш ніж 7,0% від тотальних ендогенних протеїнів [10].

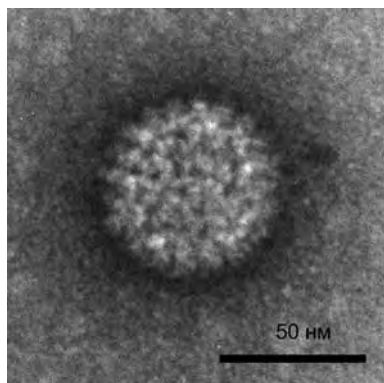


Рис. 3. Електронна мікроскопія вірусу блютангу (<http://www.cdc.gov/EID/content/13/4/614.htm>)

Транскрипційну касету, що містить ген VP7, під контролем регуляторних елементів РУБІСКО субклонували у вектор для трансформації агробактерії pBINPlus. Цей вектор має необхідні елементи для інтродукції трансгена в геном рослини (LBR, RBR) та селективний маркер стійкості до антибіотика канаміцину (*npt II*). Створена генетична конструкція отримала назву pBIN-BTV (рис. 4). Ефективність клонування гена VP7 у вектор pBINPlus було підтверджено рестрикційним аналізом (рис. 5).

Рослини тютюну потенційно можуть стати зручним об'єктом для накопичення корисних протеїнів тому, що дають багато біомаси, є відносно невибагливими до умов навколишнього середовища. Також вони мають високий регенераційний потенціал і для них розроблено відтворювану ефективну систему трансформації, опосередковану агробактерією, що дає змогу легко й швидко отримувати трансгенні рослини. Створені в результаті трансформації і відбору протягом кількох поколінь лінії зі стабільною та високою експресією трансгена можуть бути в подальшому використані в селекції або для отримання гібридних рослин, що сприятиме збільшенню виходу біомаси і відповідно виходу протеїнового продукту.

Для генетичної трансформації рослин тютюну використали векторну конструкцію pBIN-BTV. У результаті проведених експериментів з трансформації листових експлантів рослин тютюну та культивування трансформованих експлантів на регенераційно-селективному середовищі MS зі змістом канаміцину 50 мг/л було відібрано 20 стійких до селективного агента рослин-регенерантів (рис. 6). Аналіз наявності трансгенів у ДНК отриманих трансформова-

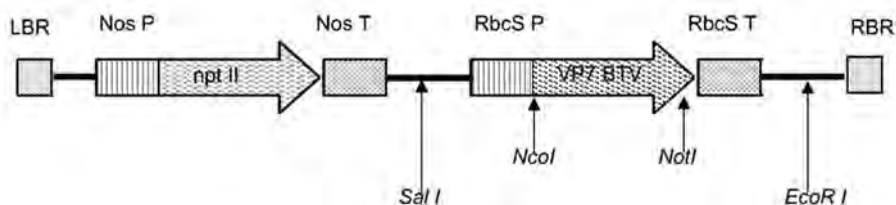


Рис. 4. Схема векторної конструкції pBIN-BTV, що містить антиген VP7 та селективний маркер стійкості до канаміцину (*npt II*):

LBR та RBR — відповідно ліва та права граничні послідовності; Nos P і Nos T — промотор і термінатор гена нопалінсинтази; RbcS P і RbcS T — промотор і термінатор гена РУБІСКО. Рестрикційні сайти клонування вказано стрілками

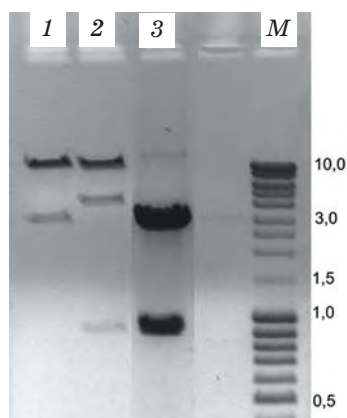


Рис. 5. Електрофореграма продуктів рестрикції плазмиди pBIN-BTV, розділених у 1,0% -му агарозному гелі в присутності броміду етидію (інвертоване фото): 1 — pBIN-BTV /*EcoRI/SalI*; 2 — pBIN-BTV /*NcoI/NotI*; 3 — pImpact-VP7/*NcoI/NotI*; M — маркер SM 1173 (Fermentas)

них рослин покоління T_0 було виконано за допомогою ПЛР з використанням пари специфічних праймерів VP7-F/VP7-R. Трансгенні рослини тютюну лінії BTV пересадили в ґрунт для одержання біомаси, насіння та проведення подальшого генетичного і молекулярно-біохімічного аналізу.

Для стабільного успадкування трансгену та уникнення розщеплення у наступних поколіннях були отримані гомозиготні за селективним геном рослини. Крім того, через можливість прояву такого явища, як «мовчання» генів, слід проводити аналіз стабільності експресії трансгенів у кількох поколіннях. Гомозиготні лінії одержали в результаті проведення аналізу розщеплення за ознакою стійкості до канаміцину в T_2 -поколінні для тих ліній, у яких було виявлено найвищий рівень експресії гетерогенного протеїну VP7, а саме ліній 1, 3 та 11 (рис. 6).



Рис. 6. Трансгенні, гомозиготні за ознакою стійкості до канаміцину рослини *N. tabacum*, лінія 11, покоління T_2

Виділення та очищення рекомбінантного протеїну VP7 з рослинної біомаси проводили за допомогою металхелатної хроматографії на Ni-NTA агарозі, оскільки моделювання генетичної конструкції передбачало наявність епітопу з шести залишків гістидину на карбокситермінальному кінці молекули протеїну. На рис. 7, В наведено електрофореграму очищеного протеїну для гомозиготної за селективним геном лінії 11, покоління

T_2 . Як видно, рекомбінантний протеїн VP7 з молекулярною масою близько 40 кД має електрофоретичну чистоту 95,0%. Отримані дані відповідають теоретично розрахованій при плануванні експерименту масі протеїну VP7 (39612,6 кД). Сумарний вихід очищеного антигена дорівнював 0,2 мг на 1 г рослинної біомаси.

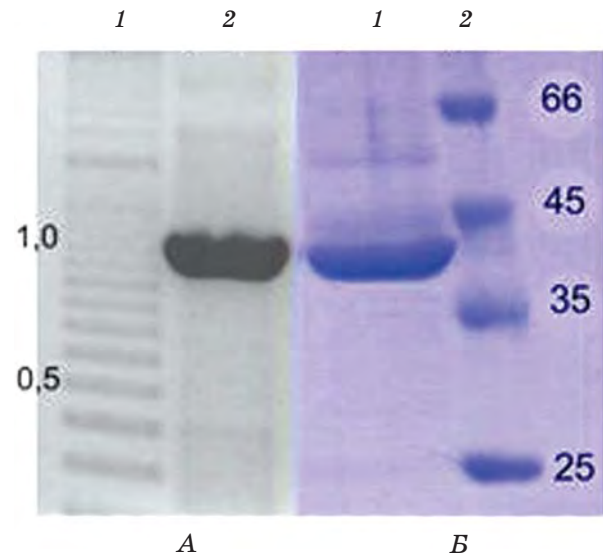


Рис. 7. Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних рослин тютюну:

А — електрофореграма продукту ПЛР (1,0% -й агарозний гель у присутності броміду етидію) (інвертоване фото):

- 1 — маркер SM1173 (Fermentas);
- 2 — трансгенна лінія тютюну 11;

Б — електрофореграма протеїну VP7 (12,0% -й ПААГ-ДСН, забарвлений Кумасі G-250):

- 1 — *N. tabacum*, лінія 11;
- 2 — маркер SM0431 (Fermentas)

Очищений антиген VP7 було проаналізовано в непрямому ІЕА з використанням позитивних ($n = 5$) та негативних ($n = 5$) сироваток, у трьох повторях. Як впливає з табл. 2, оптична густина ($ОГ_{450\text{ нм}}$) позитивних сироваток коливалась від 0,3 до 2,2, негативних — від 0,02 до 0,04. Позитивний сигнал перевищує негативний щонайменше у 15 разів (0,3/0,02), що вказує на високу імунологічну специфічність одержаного нами препарату. Високий сигнал (1,4) із сироваткою ранньої інфекції вівці (38 д. п. і.) свідчить про високу чутливість ІЕА. При цьому, стандартне відхилення результатів у повторях не перевищувало 10,0%, що вказує на відтворюваність результатів ІЕА у повторях.

Таблиця 2. ІЕА із використанням рекомбінантного антигену VP7, BTV

Назва зразка	Характеристика	Результат ІЕА, $OG_{450nm} (\pm SD^{**})$	Інтерпретація
8-Ref	Референс-сироватка BTV серотип 8 (Ін-т Леффлера)	1,917 ($\pm 0,032$)	Позитивний
8-245	Референс-сироватка BTV серотип 8, 245 д.п.і.* (Ін-т Леффлера)	2,187 ($\pm 0,056$)	÷
8-38	Референс-сироватка BTV серотип 8, 38 д.п.і. (Ін-т Леффлера)	1,433 ($\pm 0,088$)	÷
1	Польова сироватка BTV серотип 1	1,909 ($\pm 0,014$)	÷
C+IP	Позитивний контроль з Bluetongue eLISA kit (І-нт Пурк'є)	0,350 ($\pm 0,019$)	÷
O-1	Польова сироватка, вівця	0,023 ($\pm 0,001$)	Негативний
O-2	Польова сироватка, вівця	0,028 ($\pm 0,021$)	÷
G-1	Польова сироватка, коза	0,028 ($\pm 0,003$)	÷
G-2	Польова сироватка, коза	0,031 ($\pm 0,005$)	÷
B-1	Польова сироватка, ВРХ	0,037 ($\pm 0,005$)	÷

Примітка: * — день після інфекції; ** — стандартне відхилення.

Таким чином, у даній роботі показано імунологічну активність групспецифічного антигену VP7 вірусу блютангу, одержаного в рослинах *N. tabacum*. Використання рекомбінантного антигену VP7 у ветеринарній

практиці уможливить створення вітчизняних ІЕА-діагностикумів для серологічного моніторингу та запобігання розповсюдженню блютангу територією України.

ЛІТЕРАТУРА

1. Schwartz-Cornil I., Mertens P., Contreras V. et al. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity // *Vet. Res.* — 2008. — V. 39, N 46. — P. 2–16.
2. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE 6th Ed. — 2008. — V. 1, 2. — P. 1343.
3. Afshar A., Eaton B., Wright P., Pearson J. Competitive ELISA for serodiagnosis of bluetongue: evaluation of group-specific monoclonal antibodies and expressed VP7 antigen // *J. Vet. Diagn. Invest.* — 1992. — V. 4. — P. 231–237.
4. Hamblin C. Bluetongue virus antigen and antibody detection, and the application of laboratory diagnostic techniques // *Vet. Ital.* — 2004. — V. 40, N 4. — P. 538–545.
5. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Methods in gene engineering / Molecular cloning*. Published by Mir, Moscow, 1984. — P. 143.
6. Yao J., Pang Y., Qi H. et al. Transgenic tobacco expressing *Pinellia ternata* agglutinin confers enhanced resistance to aphids // *Transgen. Res.* — 2003. — V. 12(6). — P. 715–722.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — V. 15. — P. 473–497.
8. Snedecor G. W. *Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology*. The Iowa state college press, Ames, Iowa 1957.
9. Спиридонов В. Г., Рибальченко Д. Ю., Чулак Р. М. та ін. Бактеріальний синтез IgG-зв'язувального домену білка G *Streptococcus* sp. та перспективи його використання в імунологічній практиці // *Мікробіол. журн.* — 2006. — Т. 68, № 5. — С. 31 — 35.
10. Outchkourov N., Peters J., de Jong J. et al. The promoter-terminator of chrysanthemum rbcS1 directs very high expression levels in plants // *Planta.* — 2003. — V. 216 — P. 1003–1012.

**ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕНА VP7
ВИРУСА БЛЮТАНГА ЖВАЧНЫХ
В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ
*Nicotiana tabacum***

*В. Г. Спиридонов
Е. С. Сытник
М. Ф. Парий
Н. В. Павлюченко
Д. Ю. Рыбальченко
Д. Л. Мартыненко
М. Д. Мельничук*

Украинская лаборатория качества
и безопасности продукции АПК,
Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины, Киев

E-mail: spyrydonov@ukr.net

Разработан метод получения иммунологически активного группоспецифического антигена VP7 вируса блютанга жвачных в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. Селективным скрещиванием получены гомозиготные по признаку устойчивости к канамицину линии трансгенного табака с максимальным уровнем экспрессии рекомбинантного антигена VP7. Показано, что суммарный выход очищенного антигена составляет 0,2 мг на 1 г растительной биомассы. Полученный рекомбинантный антиген VP7 может быть использован в ветеринарной практике для создания отечественных ИЭА-диагностикумов для серологического мониторинга и предотвращения распространения блютанга на территории Украины.

Ключевые слова: блютанг жвачных, трансгенные растения, рекомбинантные антигены, иммуноэнзимный анализ.

**PRODUCTION OF BLUETONGUE VP7
VIRUS ANTIGEN IN *Nicotiana tabacum*
TRANSGENIC PLANTS**

*V. G. Spyrydonov
K. S. Sytnyk
M. F. Parij
N. V. Pavluchenko
D. Yu. Rybalchenko
D. L. Martynenko
M. D. Melnychuk*

Ukrainian Laboratory of Quality and Safety
of AIC Products,
National University of Life and Environmental
Science of Ukraine, Kiyv

E-mail: spyrydonov@ukr.net

The method of receiving immunologically active and group specific antigen Vp7 of ruminant bluetongue virus in the transgenic *Nicotiana tabacum* plants is developed. The lines of transgenic tobacco, homozygous for kanamycin resistance trait have been done with the maximal level of recombinant antigen VP7 expression. It was shown that the total yield of the purified antigen composed 0.2 mg per 1 gram of plant biomass. The use of recombinant antigen VP7 in veterinary practice gives a possibility to develop ELISA kits for the serological monitoring and to prevent bluetongue distribution on territory of Ukraine.

Key words: bluetongue of ruminant, transgenic plants, recombinant antigens, ELISA.