

Перенесення гена біосинтезу інтерферону- 2b в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації

Н. А. Матвєєва, А. М. Шаховський, І. М. Герасименко,
О. Ю. Кваско, Н. В. Кучук

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, Україна, 03680

joyna56@gmail.com

*Генетична трансформація цикорію *C. intybus* L. становить інтерес з огляду на можливість створення рослин-імуномодуляторів, які містять ген інтерферону- 2b. Для отримання таких рослин оптимізовано умови регенерації цикорію сорту Пала росса та здійснено трансформацію за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Показано, що частота регенерації на середовищі з макроелементами MS, кінетином (0,5–2,5 мг/л) та -нафтилоцтовою кислотою (0,5 мг/л) сягає 100 %. З використанням полімеразно-ланцюгової реакції встановлено, що ДНК усіх проаналізованих рослин містить як селективний ген *prtII*, так і цільовий *ifn- 2b*-ген. Таким чином, методика агробактеріальної трансформації може бути застосована для отримання генетично модифікованих рослин цикорію з геном, що зумовлює синтез інтерферону- 2b.*

Ключові слова: трансформація, Agrobacterium, Cichorium intybus, інтерферон.

Вступ. *C. intybus* L. – дворічна рослина, яка належить до родини *Asteraceae*. Цикорій культивують у досить широкому географічному регіоні – у країнах Європи (Бельгія, Німеччина, Франція), у США, Південній Америці, Індії. Інтерес до цієї культури пов'язаний з тим, що її не лише вживають у їжу (зокрема, салатні сорти), а й використовують як сировину для виготовлення заміни кави. Вона також має лікарські властивості завдяки наявності інуліну, кумаринів, флавоноїдів, вітамінів [1]. Цикорій є антигепатотоксичним, противіразковим, протизапальним, кардіотонічним, діуретичним засобом, який застосовують при лікуванні діабету, СНІДу, пухлин, тахікардії тощо [2–4]. На основі цикорію розроблено низку лікарських препаратів,

серед яких ЛІВ52. Отже, зрозумілою є цікавість до нього як до об'єкта клітинної інженерії, зокрема, цей вид можна використовувати для створення рослин з імуномодулюючими властивостями.

Однією з умов ефективної трансформації рослин є наявність методик регенерації. Це дає можливість отримувати максимальну кількість пагонів з рослинних експлантів, якими можуть слугувати корені, листки, стеблові бруньки [1, 5, 6,] з частотою регенерації до 100 % [7].

Коло досліджень з генетичної трансформації цикорію досить обмежене. Експерименти в основному було спрямовано на створення рослин зі зміненим фенотипом, зокрема, з прискореним цвітінням [8], стійких до гербіцидів [9], таких, що синтезують фруктан [10]. Разом з тим, оскільки цикорій вживають у їжу без термообробки, ця рослина мо-

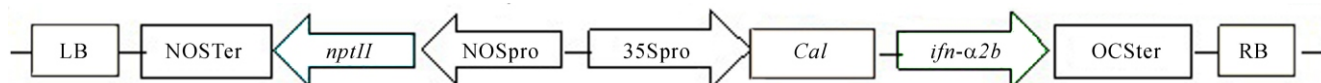


Рис. 1. Схема Т-ДНК-вектора *pCB124* для агробактеріальної трансформації *Cichorium intybus*: LB і RB – ліва і права межі Т-ДНК; *nptII* – ген неоміцинофосфотрансферази II; *ifn- 2b* – ген інтерферону- 2b; NOSpro і NOSTer – промотор і термінатор гена нопалінсинтази відповідно; 35Spro – промотор гена 35S-білка з геному вірусу мозаїки цвітної капусти; OCster – термінатор гена октопінсинтази; *cal* – кальретикулін

же бути об'єктом генетичної трансформації, зокрема, для створення рослин з імуномодулюючими властивостями. Нині розроблено методи, що дозволяють ініціювати в рослинах синтез біологічно активних речовин [11]. Фармацевтичні рекомбінантні біологічно активні білки рослинного походження мають низку переваг перед препаратами мікробного походження. Їхнє напрацювання та зберігання мають відносно невелику вартість, вони придатні для масового виробництва [12].

-Інтерферон є регулятором імунної системи ссавців. Він підвищує функцію цитотоксичних Т-лімфоцитів та фагоцитарну активність макрофагів, сприяє лізису інфікованих клітин, уповільнює розвиток вірусних інфекцій. Тому розробка нових способів отримання чистого препарату інтерферону є актуальним та перспективним напрямком біотехнологій. Нині існують фармацевтичні препарати рекомбінантного інтерферону, створені на основі бактерій методами генетичної інженерії.

Генетично модифіковані рослини з геном інтерферону отримано більше 20 років тому [13]. Метою тих робіт було використання антивірусної дії інтерферону для захисту рослин від захворювань [14, 15]. Напрямок досліджень, що активно розвивається останніми роками, є створення трансгенних рослин з геном інтерферону. Хоча на сьогодні модифіковані рослини ще не мають практичного застосування, однак вже продемонстровано можливість експресії гена інтерферону в рослинах картоплі [16], рису [17], салату [18]. Показано, що рекомбінантний інтерферон має імуногенну активність [19], отже, може бути застосований з лікувальною метою.

Матеріали і методи. Вихідним матеріалом служувало насіння цикорію *C. intybus* сорту Пала росса. Насіння послідовно стерилізували в 70 %-му етаполі (1 хв) і 25 %-му розчині комерційного препарату «Білизна» (10 хв), після чого промивали в дис-

тильованій воді (60 хв). Пророщували насіння на агаризованому середовищі MS [20] при 16-год світловому фотоперіоді та температурі 24 С.

Для регенерації пагонів і трансформації використовували сім'ядольні та справжні листки 10–12-денних проростків. На них робили поперечні надрізи та культивували при 16-год світловому фотоперіоді та температурі 24 С.

Частоту регенерації рослин із сім'ядольних та листових експлантів визначали, культивуючи експланти на середовищах, що відрізнялися вмістом як солей, так і фітогормонів (табл. 1).

Трансформацію здійснювали за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* (штам GV3101) з векторною конструкцією *pCB124* (рис. 1). Т-ДНК вектора *pCB124* містила селективний ген *nptII*, цільовий ген *ifn- 2b* та кальретикулін – лідерну послідовність, що забезпечує накопичення цільового білка в ендоплазматичному ретикулумі.

Бактерії вирощували на середовищі LB [23] з антибіотиками (100 мг/л карбеніциліну, 50 мг/л рифампіцину, 25 мг/л гентаміцину) протягом 48 год за температури 27 С. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням (300 g, 10 хв), осад ресуспендували в розчині 10 мМ MgSO₄. Листки з попередньо зробленими надрізами інкубували в бактеріальній суспензії упродовж 30 хв, промокали фільтрувальним папером і культивували на агаризованому середовищі MS протягом двох діб. Після цього експланти переносили послідовно на середовище № 1 (на один тиждень) та № 2 (табл. 1) з додаванням антибіотиків канаміцину (25 мг/л) і цефотаксиму (600 мг/л). Пагони, що утворилися, укорінювали на середовищі MS без гормонів з антибіотиками у таких самих концентраціях.

Геномну ДНК виділяли методом СТАВ із зелених листків стерильних рослин [24]. ПЛР геномної ДНК проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою криш-

Таблиця 1

Склад поживних середовищ для дослідження регенерації рослин із сім'ядольних та листових експлантів цикорію

Складові середовища	Вміст у середовищі, мг/л							
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8
Макроелементи	MS*	MS	MS	MS	B ₅ **	B ₅	B ₅	B ₅
Мікроелементи	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Тіамін	1	1	1	1	1	1	1	1
Піридоксин	1	1	1	1	1	1	1	1
Нікотинова кислота	1	1	1	1	1	1	1	1
Біотин	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Са-пантотенат	1	1	1	1	1	1	1	1
Інозитол	100	100	100	100	100	100	100	100
Кінетин	2,5	0,5	–	–	2,5	0,5	–	–
Бензиламінопурин	–	–	2,5	0,5	–	–	2,5	0,5
-Нафтилоцтова кислота	0,5	0,05	0,5	0,05	0,5	0,05	0,5	0,05
Морфоліноетансульфонова кислота	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Гідролізат казеїну	300	300	300	300	300	300	300	300
Цукроза	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000
Агар	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000

Примітка. *Макро- та мікроелементи за MS [20]; **макроелементи за B₅ [21].

Таблиця 2

Праимери, використані для підтвердження присутності генів *nptII* та *ifn- 2b*

Ген	Праимер	Розмір ампліфікованого фрагмента, п. н.
<i>nptII</i>	5'- cctgaatgaactccaggacaggca-3' 5'- gctctagatccagagtcctcagaag-3'	622
<i>ifn- 2b</i>	5'-ctcctgcttgaaggacag-3' 5'-ggagtcctcctcatcag-3'	264

кою в пробірках з ультратонкими стінками. Реакційна суміш містила одноразовий ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 0,2 мкмоль відповідних праймерів (табл. 2), 200 мкмоль кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Таq-полімерази, 10–50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші становив 20 мкл.

Умови ампліфікації: первинна денатурація – 90 °С, 3 хв; 30 циклів ампліфікації (94 °С, 30 с –

60 °С, 30 с – 72 °С, 30 с); остаточна полімеризація – 72 °С, 5 хв.

Результати і обговорення. Ефективність отримання генетично модифікованих рослин при застосуванні методу агоробактеріальної трансформації залежить від регенераційної здатності використаних експлантів. У зв'язку з цим нами вивчено особливості регенерації рослин цикорію на поживних середовищах, що відрізнялися вмістом як макро-

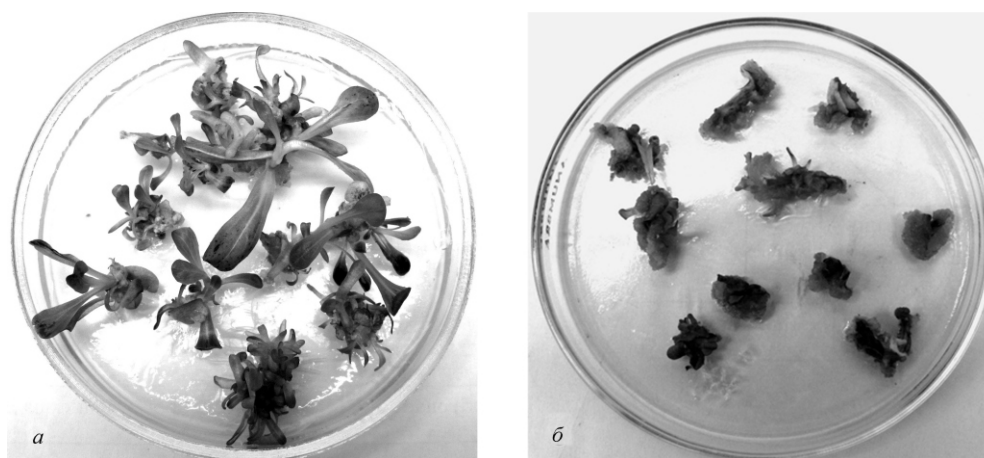


Рис. 2. Вплив мінеральних компонентів середовища на регенерацію рослин цикорію: *a* – макроелементи MS, 0,5 мг/л кінетину, 0,5 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК); *б* – макроелементи B₅, 0,5 мг/л кінетину, 0,5 мг/л НОК

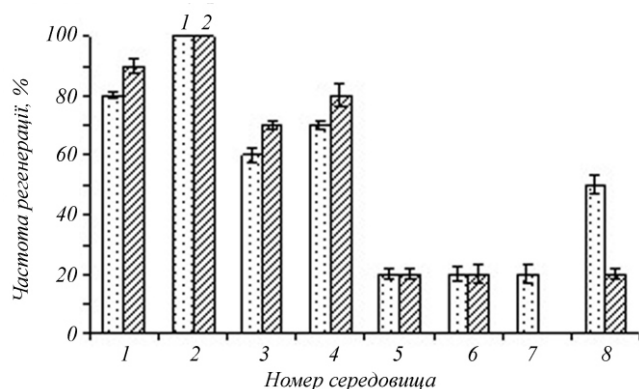


Рис. 3. Частота регенерації пагонів із сім'ядольних (1) та справжніх листків (2) цикорію на різних середовищах

елементів, так і фітогормонів (середовища №№ 1–8, табл. 1).

Експерименти виявили відсутність значних відмінностей у частоті регенерації пагонів з експлантів двох типів – сім'ядольних та справжніх листків – на всіх середовищах, за винятком середовища № 7, причому утворення пагонів спостерігалось уже через 10–15 діб.

Порівняння частоти регенерації на середовищах з різним вмістом макроелементів показало, що оптимальною умовою є наявність макросолей MS. Так, через 3 тижні частота регенерації пагонів на цих середовищах становила 60–100 %, у той час як у присутності макроелементів за B₅ цей показник дорівнював 0–50 %. (рис. 2, 3). Середовища MS та B₅ відрізняються вмістом азоту (у формі катіонів NH₄⁺ та аніонів NO₃⁻), концентрація якого в середо-

вищі MS значно вища. Можливо, підвищення концентрації азоту стимулює процес регенерації рослин цикорію.

При порівнянні впливу фітогормонів на процес регенерації пагонів встановлено, що використання середовища, яке містить кінетин, підвищує частоту регенерації відносно середовища з бензиламінопурином (БАП). Зокрема, частота регенерації на середовищі № 2 (MS, 0,5 мг/л кінетину) перевищувала таку для середовища № 4 (MS, 0,5 мг/л БАП) та становила відповідно 100 і 70 %. Крім того, час, потрібний для ініціювання регенерації, на середовищах № 1 та № 2 з кінетином виявився значно меншим (7–10 діб), ніж на середовищах № 3 та № 4 з БАП (14–20 діб). Збільшення концентрації цитокінінів (як кінетину, так і БАП) з 0,5 до 2,5 мг/л не призводило до зростання частоти регенерації.

Таким чином, показано, що використання поживного середовища з макроелементами MS та кінетином дозволяє отримати регенерацію рослин цикорного салату з максимальною частотою (до 100 %). Оскільки висока ефективність регенерації пагонів є однією з головних умов успішної трансформації, таке середовище і використане в експериментах зі створення генетично модифікованих рослин.

Трансформацію проводили за допомогою *A. tumefaciens* з векторною конструкцією *pCB124*, Т-ДНК якої містила селективний ген *nptII* та цільовий – *ifn- 2b*. Експресія гена *nptII* надає переваг трансформованим клітинам, проліферація яких

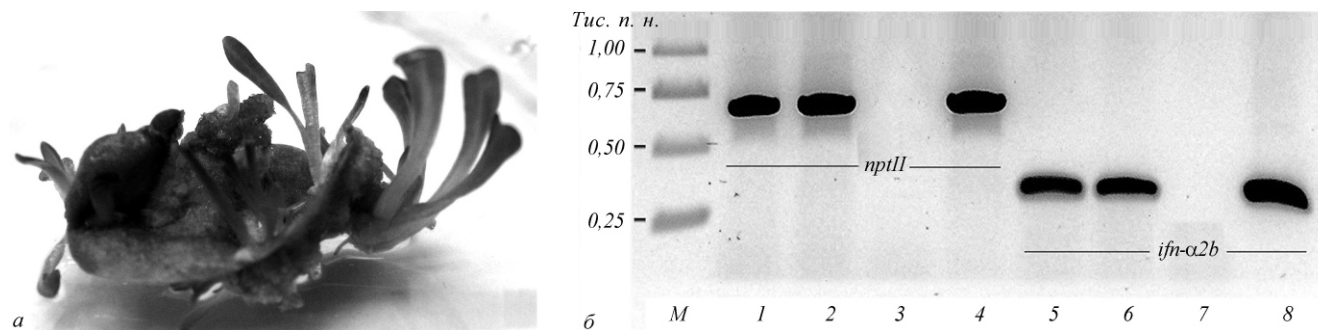


Рис. 4. Регенерація стійких до канаміцину рослин цикорію сорту Пала росса (а) та ПЛР-аналіз тотальної ДНК з рослин, трансформованих конструкцією *pCB124*, на присутність генів *nptII* та *ifn-2b* (б: 1, 2, 5, 6 – трансформовані рослини; 3, 7 – контрольні рослини; 4, 8 – ДНК плазмиди *pCB124*; М – маркер)

відбувається за присутності селективної концентрації канаміцину. Для визначення останньої протестовано п'ять концентрацій антибіотика – 10, 25, 50, 100 та 150 мг/л. При концентрації канаміцину 25 мг/л і вище зелені пагони, що регенерують з сім'ядольних листків, були відсутніми, експланти гинули. Таким чином, концентрацію 25 мг/л визначено як селективну.

При культивуванні експлантів на середовищах №№ 1 і 2 з канаміцином (25 мг/л) та цефотаксимом (600 мг/л) для елімінації бактерій уже через 7–14 діб спостерігали утворення пагонів (рис. 4, а).

Частоту трансформації (тобто частоту регенерації зелених рослин за присутності селективної концентрації канаміцину) визначали за відношенням кількості експлантів із зеленими на селективному середовищі пагонами до загальної кількості експлантів у відсотках. Вона становила 26,9 %. Очевидно, досить високий показник пов'язаний з високою регенераційною здатністю рослин цього сорту (до 100 %). При селекції експлантів на середовищі з антибіотиками білі рослини були відсутні.

ПЛР-аналізом тотальної ДНК восьми рослин, регенованих на селективному середовищі, визначено присутність як селективного гена *nptII*, так і цільового гена *ifn-2b* (рис. 4, б).

Таким чином, встановлено, що найвищу частоту регенерації рослин (до 100 %) спостерігали при культивуванні сім'ядольних та справжніх листків цикорію на середовищі, що містило макроелементи MS, кінетин (0,5–2,5 мг/л) та –НОК (0,5 мг/л). Після агробактеріальної трансформації конструкцією *pCB124* отримано трансформовані рослини з

частотою 26,9 %. ПЛР-аналізом показано, що ДНК із всіх досліджуваних рослин мала як селективний *nptII*, так і цільовий *ifn-2b*-ген. Використання гена *nptII* в конструкції *pCB124* є ефективним, оскільки дає можливість відбору саме трансформованих рослин. Отже, метод агробактеріальної трансформації може бути застосований для отримання трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону-2b.

N. A. Matvieieva, A. M. Shachovsky, I. M. Gerasymenko, O. Yu. Kvasko, N. V. Kuchuk

Agrobacterium-mediated transformation of *Cichorium intybus* L. with interferon-2b gene

An efficient method for the plant regeneration and Agrobacterium mediated transformation with interferon-2b gene has been developed for chicory *C. intybus* L. cv. Pala rossa. The regeneration with efficiency about 100 % was induced on the MS medium supplemented with 0.5–2.5 mg/l kinetin and 0.5 mg/l NAA. The transformed plantlets were recovered at a frequency 26,9 % on basal medium with 25 mg/l kanamycin. According to PCR-analysis the *nptII* and *ifn-2b* genes were integrated into the genome of transformed plants.

Keywords: transformation, Agrobacterium, *Cichorium intybus*, interferon.

Н. А. Матвеева, А. М. Шаховский, И. М. Герасименко, Е. Ю. Кваско, Н. В. Кучук

Перенос гена биосинтеза интерферона-2b в растения цикория (*Cichorium intybus* L.) методом агробактериальной трансформации

Резюме

Генетическая трансформация цикория *C. intybus* L. представляет интерес с точки зрения возможности создания растительных-иммуномодуляторов, содержащих ген биосинтеза интерферона-2b. Для получения таких растений оптимизированы условия регенерации растений сорта Пала росса и проведена

трансформація з допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Показано, що частота регенерації на середі з макроелементами MS, кінетином (0,5–2,5 мг/л) і -нафтилуксусної кислотою (0,5 мг/л) досягає 100 %. З використанням полімеразної ланцюгової реакції встановлено, що ДНК всіх проаналізованих рослин включає як селективний ген *nr1II*, так і целевий *ifn- 2b*-ген. Таким образом, методика агробактеріальної трансформації може бути використана для отримання генетично модифікованих рослин цикорія з геном, обумовлюючим синтез інтерферона- 2b.

Ключові слова: трансформація, *Agrobacterium*, *Cichorium intybus*, інтерферон.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Rehman R. U., Israr M., Srivastava P. S., Bansal K. C., Abdin M. Z. *In vitro* regeneration of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) from leaf explants and accumulation of esculin // *In vitro Cell. Develop. Biol.*–2003.–**39**, N 2.–P. 142–146.
2. Gadgoli C., Mishra S. H. Antihepatotoxic activity of *Cichorium intybus* // *Ethnopharmacology*.–1997.–**58**, N 2.–P. 131–134.
3. Hughes R., Rowland I. R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic *Chicory fructans* in the rat colon // *Carcinogenesis*.–2001.–**22**, N 1.–P. 43–47.
4. Ahmad K. D., Gilani S. N., Akhtar A. H., Khan L. Antiulcerogenic evaluation of aqueous extracts of *Cichorium intybus* and *Phyllanthus emblica* in normal and aspirin-treated rats // *Pakistan J. Sci. and Indust. Res.*–1998.–**41**, N 2.–P. 92–96.
5. Profumo P., Gastaldo P., Caffaro L., Dameri R. M., Roti Michelozzi G., Bennici A. Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L.: II. Effect of different hormonal treatments // *Protoplasma*.–1985.–**126**, N 3.–P. 215–220.
6. Yucesan B., Turker A. U., Gurel E. TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.–2007.–**91**, N 3.–P. 243–250.
7. Velayuthan P., Ranjithakumari B. D., Baskaran P. An efficient *in vitro* plant regeneration system for *Cichorium intybus* L. – an important medicinal plant // *J. Agricult. Technol.*–2006.–**2**, N 2.–P. 287–298.
8. Bais H. P., Venkatesh R. T., Chandrashekar A., Ravishankar G. A. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Witloof chicory – *in vitro* shoot regeneration and induction of flowering // *Curr. Sci.*–2001.–**80**, N 1.–P. 83–87.
9. Vermeulen A., Vaucheret H., Pautot V., Chupeau Y. *Agrobacterium* mediated transfer of a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene confers resistance to chlorsulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.) // *Plant Cell Rep.*–1992.–**11**, N 5–6.–P. 243–247.
10. Vijn I., van Dijken A., Sprenger N., van Dun K., Weisbeek P., Wiemken A., Smeekens S. Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase // *The Plant J.*–1997.–**11**, N 3.–P. 387–398.
11. Rice J., Ainley W. M., Shewen P. Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health // *Anim. Res. Rev.*–2005.–**6**, N 2.–P. 199–209.
12. Daniell H., Streatfield S. J., Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // *Trends Plant Sci.*–2001.–**6**, N 5.–P. 219–226.
13. Orchansky P., Rubinstein M., Sela I. Human interferons protect plants from virus infection // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–1982.–**79**, N 7.–P. 2278–2280.
14. Antoniw J. F., White R. F., Carr J. P. An examination of the effect of human -interferons on the infection and multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco // *Phytopath. Z.*–1984.–**109**, N 4.–P. 367–371.
15. Rudas V. A., Piven' N. M., Rivkin M. I., Vershinin A. V., Infante D. C. The genetic transformation of *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* by using *Agrobacterium tumefaciens* carrying a plasmid with the human beta-interferon gene // *Tsitol. Genet.*–1997.–**31**, N 2.–P. 17–22.
16. Ohya K., Matsumura T., Ohashi K., Onuma M., Sugimoto C. Expression of two subtypes of human IFN- in transgenic potato plants // *J. Int. and Cytokine Res.*–2001.–**21**, N 8.–P. 595–602.
17. Masumura T., Morita S., Miki Y., Kurita A., Morita S., Shirono H., Koga J., Tanaka K. Production of biologically active human interferon- in transgenic rice // *Plant Biotechnol.*–2006.–**23**, N.1.–P. 91–97.
18. Li J., Chen M., Liu X.-W., Zhang H.-Ch., Shen F. F., Peng G. W. Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce // *Scientia Horticult.*–2007.–**112**, N 3.–P. 258–265.
19. Chen T.-L., Lin Y.-L., Lee Y.-L., Yang N.-S., Chan M.-T. Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures // *Transgen. Res.*–2004.–**13**, N 5.–P. 499–510.
20. Murashige T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*–1962.–**15**, № 3.–P. 473–497.
21. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.*–1968.–**50**, № 1.–P. 148–151.
22. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F. *Molecular cloning: A laboratory manual*.–New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982.–545 p.
23. Draper J., Scott R. The isolation of plant nucleic acids // *Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual* / Eds J. Draper et al.–Oxford etc.: Blackwell Sci. Publ., 1988.–355 p.

УДК 575.222.7:581.1

Надійшла до редакції 12.12.08