

УДК 57.084.1: 578.71

**БИОТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МНОЖЕСТВЕННЫХ ЭФФЕКТОВ
ДЕЙСТВИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *UGT/IAGLU* ИЗ КУКУРУЗЫ *ZEA MAYS L.* ДЛЯ
УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР И
АКТИВНОГО СИНТЕЗА АНТИГЕННЫХ БЕЛКОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН
ПРОТИВ ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Н.И. Рекославская, А.В. Третьякова, А.А. Чемезова, Ю.В. Нурминская, А.В. Чемезов

Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской Академии Наук 664033 Россия, Иркутск, ул. Лермонтова, 132. e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

The *ugt/iaglu* gene was isolated from a sweet corn seedling cDNA library in the laboratory under Professor R.S. Bandurski (MSU, East Lansing, USA) and shared with Dr N. I. Rekoslavskaya for further experimental work. The *ugt/iaglu* gene encoded the UDPG-transferase, which participated in the metabolism of IAA, the main plant phytohormone, by binding IAA with glucose and thus creating a depot of auxin in plants. In our work, we used the gene *ugt / iaglu* to improve the hormonal status as much as 20 species of plants both cultivated and wild species by inserting the gene *ugt/iaglu* in binary agrobacterial vectors. As a result of transformation, an increase of growth, development, rooting, and fruit formation was observed in all transgenic plant species tested. The highest level of free and bound IAA was determined and a very high specific activity of UDPG-transferase in these transgenic plants was found. The transformation characteristics were stable in the 16 seed generations. Due to improvement of hormonal status in transgenic plants, the gene *ugt/iaglu* was recruited in experience in biotechnological works for developing of preventive vaccines against HIV/AIDS and hepatitis B (HBV) using classical binary agrobacterial vectors. The coat and core proteins of HIV and HBV were barely expressed in transgenic tomato with the low coefficient of transformation for HIV proteins which was less than 0,001-0,01% and for HBV proteins about 0,01% of yield. But the addition of the *ugt/iaglu* gene revealed in 50% of surviving explants for HIV transformants and up to 100% of surviving for HBV transgenic explants. Furthermore, the yields of target vaccine proteins both for HIV and for HBV increased twice or more. We developed our own new plant expression system on the basis of RdRP (RNA dependent RNA polymerase, RNA encoded) from CMV with antisilent RNA 2b encoded in the same frame as RNA 2a. As the second antisilencer gene, we used the *ugt/iaglu* gene form *Z. mays* because the *ugt / iaglu* gene not only stabilized the hormonal homeostasis of tomato transgenic fruits by prolonging its synthesizing activity, but highly increased the accumulation of "early" and "late" proteins of HPV16 high-risk papillomavirus HPV16 during the development of both prophylactic and therapeutic vaccines against cancer. The HPV antigenic protein yield was about 25% per 1 mg of total soluble protein in transgenic tomato fruit. The high yield of antigenic HPV proteins in our plant expression system allowed us to raise antibodies in mice with high titer, strong avidity, and remarkable cross-reactivity with antigens from unrelated HPV families. In our experiments with mice, antibodies to HPV16 L1, HPV18 L1, HPV16 E2, and HPV6 L1 have higher titer and avidity than analogs from the Santa Cruz company. According to the data these multiple enriched functions of the *ugt/iaglu* gene could not be explained only by the binding and liberation of free auxin during development (for example, fast growth of baby corn after pollination), but by opening new reading frames and accelerating gene expression. Glycosylation and destruction of protein repressors at promoter sites do play important role in this way.

Keywords: IAA, hormonal homeostasis, crop productivity, vaccines development

1. Использование гена *ugt/iaglu* из кукурузы *Zea mays L.*, кодирующего синтез УДФГ-трансферазы/ИУК-глюкоза синтазы (рис. 1) для трансформации картофеля и томата (рис. 2,3).

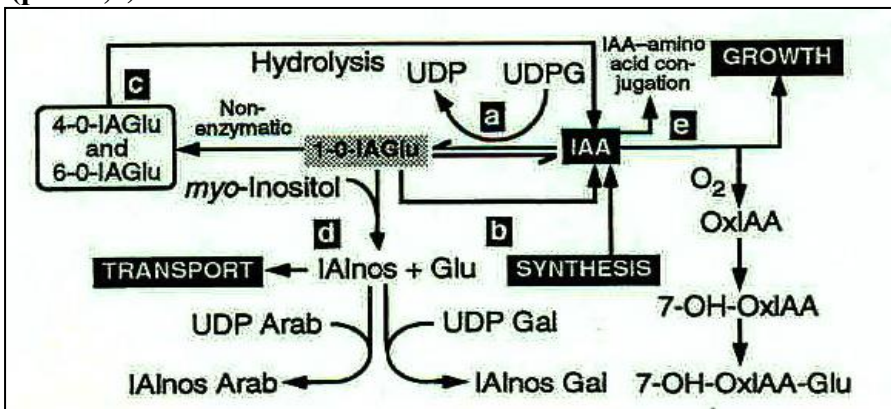


Рисунок 1. Схема конъюгирования ИУК с глюкозой, осуществляемого УДФГ-трансферазой/ИУК-глюкоза синтазой

УДФГ-трансфераза осуществляет конъюгирование ИУК и других ксенобиотиков с целью регуляции их концентрации и сохранения гормонального статуса, гомеостаза и устойчивости к неблагоприятным факторам среды.

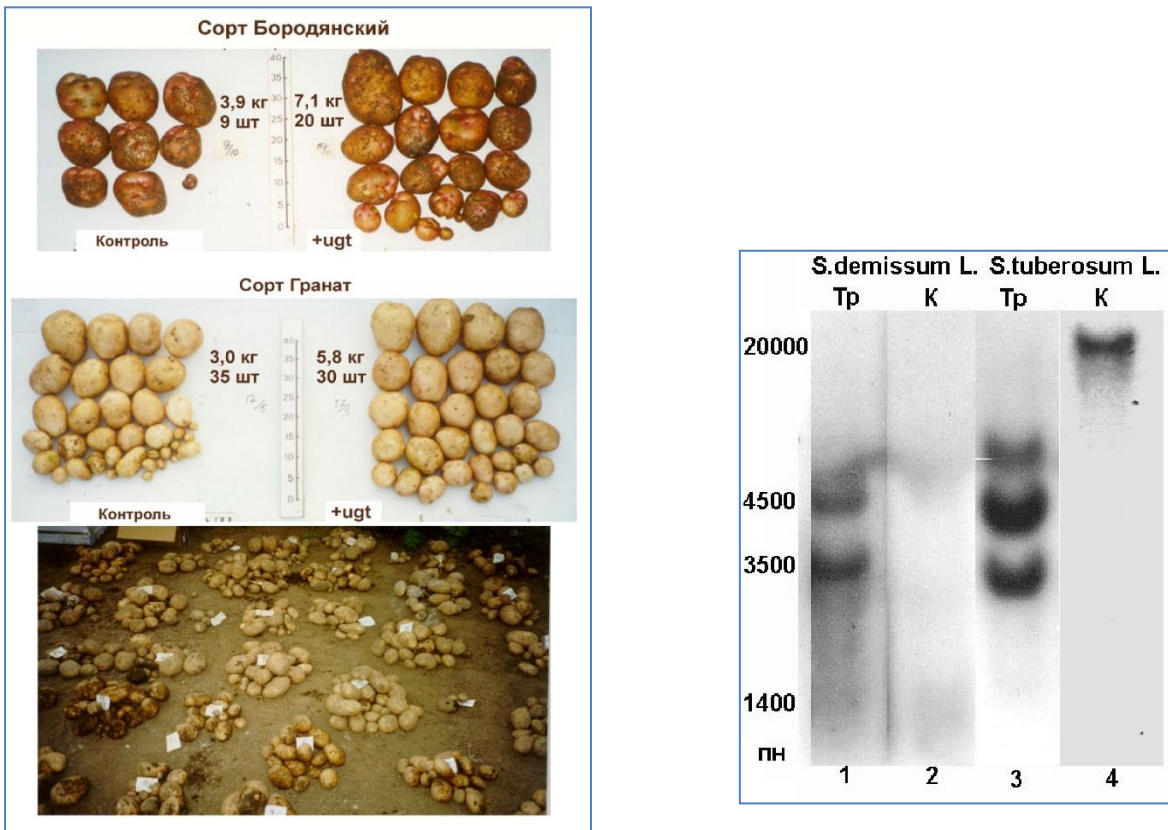


Рисунок 2А. Продуктивность трансгенного картофеля (с.Бородянский и с. Гранат) с геном *ugt/iaglu*. Внизу: каждая кучка — это урожай клубней с одного куста картофеля. Рисунок 2Б. Саузерн блот гибридизация ДНК. ДНК картофеля гибридизовали с *pBlueScript/ugt*, меченого с ^{32}P -АТФ (электрофорез в 1% агарозе). К - ДНК выделена из нетрансгенного картофеля, Тр - ДНК выделена из трансгенного картофеля. *Solanum demissum L.* - дикий тип, *Solanum tuberosum L.* - с. Бородянский



Рисунок 3. А - Селекция трансгенных проростков томата (с.Вентура) с геном *ugt* (слева), проростки нетрансгенного томата на среде МС, содержащей 1 мг/л 2,4-Д (справа). Б - ПЦР с ДНК, выделенной из трансгенных проростков томата с геном *ugt*. Праймеры к фрагменту в 357 пн гена *ugt*. Крайняя справа дорожка - стандарт DNA ladder 100 bp. Представлены образцы ПЦР ДНК из разных индивидуальных проростков трансгенного томата.



Рисунок 4. Слева - продуктивность трансгенного томата с геном *ugt* после селекции на 2,4-Д. Справа - сравнение урожайности нетрансформированного томата и трансгенного с геном *ugt* томата с одного растения (с. Вентура).

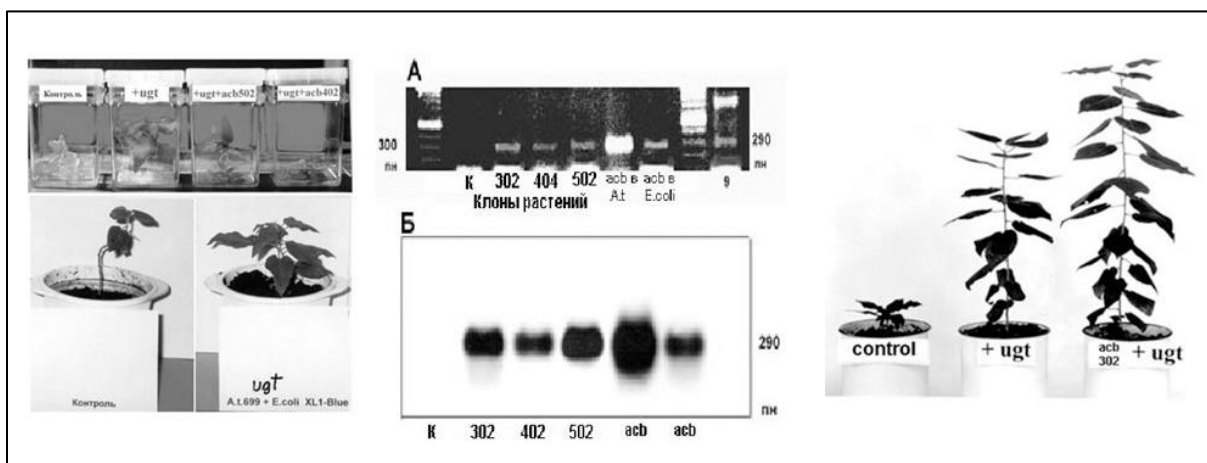


Рисунок 5. Получение быстрорастущих трансгенных растений осины с геном *ugt* и *acb* (кодирующим синтазу мембранного ацилсвязывающего белка). Слева - трансформация *in vitro*, в центре: А - ПЦР с праймерами к гену *acb* (300 пн), Б - саузерн блот гибридизация ДНК осины с геном *acb* (pBIN), меченым ^{32}P -АТР. Представлены индивидуальные клоны трансгенной осины. Справа - акклиматизация на воздухе трансгенных и контрольного растений осины, выращенных *in vitro*.



Рисунок 6. Слева - трансгенные и контрольные растения осины в поле в первый год выращивания, справа - трансгенное и контрольное растения осины через 3 года выращивания в полевых условиях.

Контроль **Трансгенный**

Разовый сбор

контроль трансгенный

Средняя масса плода при сборе=132 г

Урожай, кг/кв.м:
контроль = 15,5, трансгенный = 46,4
Количество плодов, шт :
контроль = 121, трансгенный = 351

2642
1000
500
234
пн

1 2 3 4

1, 2 - ПЦР фрагмента гена ugt 234 пн в ДНК трансгенного огурца,
3 - ugt в pBlueScript,
4 - ДНК стандарт

Получение трансгенной пекинской капусты

Контроль **acb513+ugt+аср**

Вес, кг
1,0 1,5

ПЦР геномной ДНК салата с праймерами к фрагменту 234 пн гена ugt из кукурузы

234 пн

Саузерн блот гибридизация геномной ДНК пекинской капусты с зондом фрагмента 234 пн гена ugt из кукурузы

234 пн

Контроль Трансгенный рBlue Script

Рисунок 7. Получение трансгенных растений огурца (F1 Моринда) и пекинской капусты.

2. Использование гена *ugt/iaglu* для усиления экспрессии антигенных вирусных белков при получении вакцин

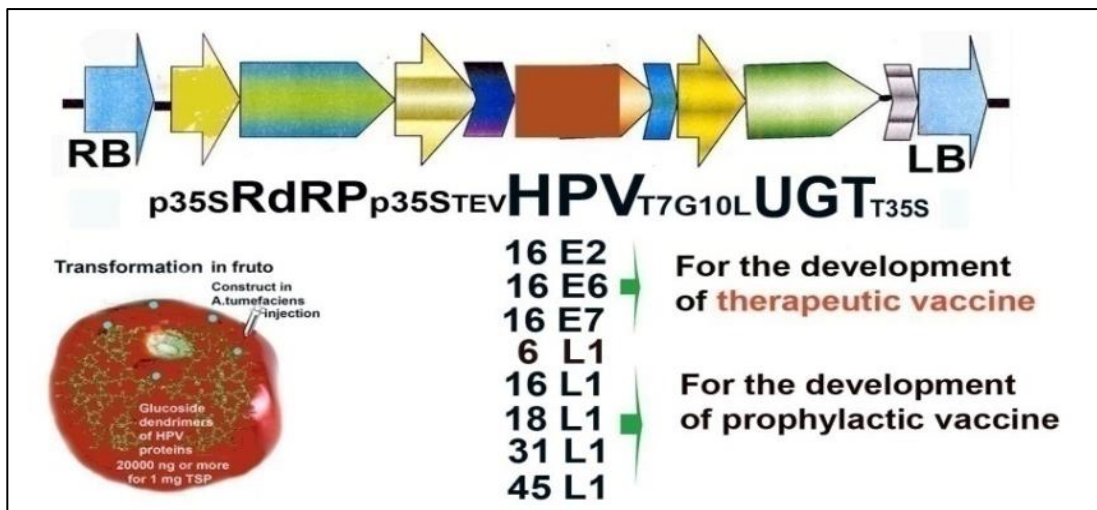


Рисунок 8. Включение гена *ugt* в генетические конструкции для синтеза антигенных белков позволилократно увеличить синтез трудно экспрессируемых вирусных белков в плодах томата

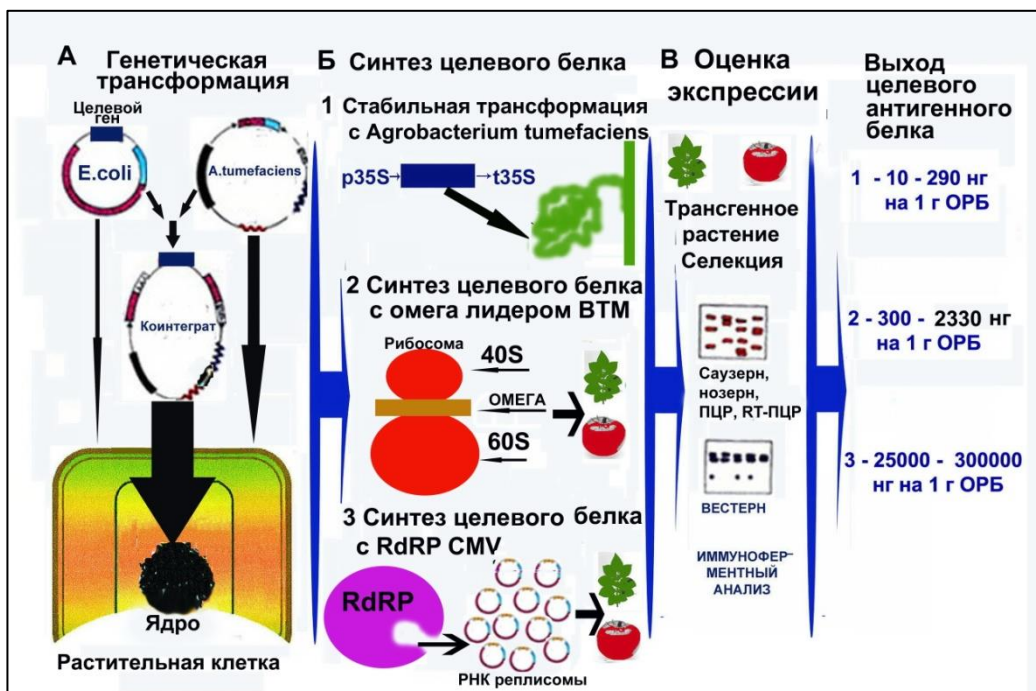


Рисунок 9. Получение антигенного белка при стабильной трансформации с агробактерией и использованием омега лидера РНК ВТМ и RdRP СМВ. А – Генетическая трансформация, Б – 3 варианта синтеза антигенного белка: 1 – стабильная трансформация с *A. tumefaciens*, 2 – с омега лидером РНК ВТМ, 3 – с включением RdRP репликазы

Таким образом, использование гена *ugt/iaglu* в рекомбинатных технологиях оказывается весьма перспективным.