

Автор: Макеева Полина Александровна, 11 класс

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ БЕЛКА В  
РАСТЕНИИ: ОТ МОДЕЛЬНОГО GFP К ЦЕЛЕВОМУ ИММУНОГЛОБУЛИНУ G.

ГБОУ Школа № 141

Город Москва

2019 г.

Научные руководители:

Николай Валентинович Ледуховский

Татьяна Валерьевна Комарова

## СОДЕРЖАНИЕ

1 – Введение.....	2
2 – Цели, задачи, методы исследования.....	4
3 – Оборудование.....	6
4 – Ход работы.....	7
5 – Вывод.....	14
6 – Литература.....	15

## АКТУАЛЬНОСТЬ

С помощью генной инженерии человек научился продуцировать необходимый ему белок в системе, которая этот конкретный белок не воспроизводит. Наиболее часто используемые системы для производства целевых белков — дрожжи, бактерии и клетки млекопитающих. Однако в случае бактерий производство белка эукариотической клетки сильно ограничено его (белка) простотой, вследствие чего в бактерии нельзя продуцировать сложные белки, которые должны быть правильно свернуты, проходить стадию сборки или иных модификаций. К подобным белкам относятся и антитела. Кроме того, из-за слишком высокого уровня накопления целевого белка в клетках бактерий, этот белок может формировать нерастворимые образования (тельца включения), которые надо переводить в активную растворимую форму, а также удалять специфические бактериальные токсины, присутствующие в тельцах включения.

Дрожжи — эукариоты, и некоторых вышеперечисленных недостатков бактериальной системы у них нет, но очень большое количество белка деградирует спустя короткое время после их производства. Кроме того, образование правильной структуры белка (фолдинг) и необходимые для его функционирования модификации могут не проходить должным образом.

В клетках животных так же можно производить белок, и как раз культура клеток млекопитающих является основной системой, в которой в настоящее время производятся большинство сложных белков, используемых в качестве лекарственных препаратов. Однако, эта система предполагает существенные финансовые затраты

вследствие невысокой продуктивности и также необходимости соблюдения стерильности. В итоге, стоимость препаратов, произведенных в культуре клеток млекопитающих, очень высока. В связи с этим, ведется постоянный поиск альтернативных систем продукции. Одной из многообещающих и перспективных платформ являются растения.

Помимо снижения себестоимости конечного продукта, растения гарантируют биобезопасность продуцируемого в них белка, т.к. не содержат компонентов животного происхождения, например, нуклеиновых кислот клеток-продуцентов или их вирусов и прочих потенциально возможных загрязнений. Кроме того, растительная клетка так же как и животная является эукариотической, механизмы синтеза и последующих модификаций белка принципиально не отличаются от таковых для животной клетки. Растительная клетка способна производить (и запасать) большое количество белка, в т.ч. сложные белковые молекулы. Растение — самостоятельная система, способная наработать целевой белок в больших количествах при создании минимальных (по сравнению с культурой клеток млекопитающих) условий для роста и развития (свет, вода и минеральные вещества).

В своей работе я провожу анализ различий в наработке целевого (иммуноглобулин G) и модельного белка (GFP), а также подбираю оптимальные условия для высокого выхода необходимого белка в растительной системе.

#### ЦЕЛИ:

Исследование оптимальных условий для временной продукции белка животного происхождения растением *Nicotiana benthamiana* на примере GFP и иммуноглобулина G человека.

#### ЗАДАЧИ:

Определение оптимального разведения суспензии агробактерии и продолжительности наработки:

- а) модельного белка GFP,
- б) целевого иммуноглобулина G человека в листьях растения.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Инfiltrация: введение суспензии агробактерии (*Agrobacterium tumefaciens*) в межклеточное пространство листа. *Agrobacterium tumefaciens* позволяет переносить кольцевую ДНК (плазмиду), содержащую ген целевого белка, в клетки растений (в их ядро).
- Электрофорез: способ разделения заряженных молекул белков под действием электрического тока, в данной работе средой является полиакриламидный гель (ПААГ)
- Высечка: фрагмент листа (в данном случае 1 см в диаметре) растения из зоны инfiltrации суспензией бактерий
- GFP: зелёный флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein) медузы *Aequorea victoria*.
- Иммуноглобулин G: антитело человека; в данной работе антитело, используемое при терапии рака молочной железы человека.

#### ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ

- Денситометр: прибор для измерения оптической плотности.
- Флуориметр: измеряет интенсивность флуоресценции белка в растворе.
- Ультрафиолетовая лампа: излучает свет с длиной волны 360 нм.
- Чашка Петри.
- Механический дозатор.
- Аппарат для проведения электрофореза белков.
- Целит: абразив.
- Краска Кумасси: раствор, содержащий краситель Кумасси, используемый для окрашивания белков.

- Буфер (1×PBS; 1×GFP): содержат необходимый для экстракции набор солей и поддерживает постоянную pH.
- Среда LB: питательный раствор для выращивания культур бактерий.
- Полиакриламидный гель: гель, полученный за счет полимеризации акриламида, используется для разделения белков методом электрофореза.
- Вирусные векторы 11932 для продукции GFP и 11333 с 11520 – для продукции иммуноглобулина (кодируют лёгкую и тяжёлую цепь, соответственно): генетические конструкции на основе геномов вирусов растений, содержащие ген целевого белка. Используются для повышения уровня продукции, т.к. способны сами мультиплицироваться в клетке растения.

## ХОД РАБОТЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ:

### ЭКСПЕРИМЕНТ С GFP.

GFP — компактный и стабильный белок, который должен нарабатываться клеткой в большом количестве. Иными словами, ожидается высокая производительность белка растением даже при низкой плотности суспензии бактерии (высоком разведении). Учитывая, что во всех экспериментах используются вирусные векторы, которые при попадании в клетку могут мультиплицироваться и переходить из клетки в клетку, до достаточно доставить ДНК с геном целевого белка лишь в небольшое количество клеток.

Первый день эксперимента, в жидкую питательную среду для бактерий (LB) с 3-мя видами антибиотиков (Гентамицин 25 мкг/мл, Рифампицин 50 мкг/мл; Канамицин 100 мкг/мл) была засеяна агробактерия с плазмидой. Антибиотики нужны для того, чтобы в среде выросли только агробактерии (за это отвечают гентамицин и рифампицин), содержащие плазмиду с геном целевого белка (за это отвечает канамицин).

На следующий день измерена оптическая плотность (мутность суспензии) полученной ночной культуры агробактерий в среде LB с помощью денситометра при длине волны 600 нм. Плотность бактерий при разведении в 10 раз: 0,38, при разведении в 100: 0,038 далее вне чувствительности прибора. Разведение проводилось буфером для инфильтрации.

Разведения агробактерий в 10, в 100, в 1000 и в 10000 раз были введены в листья 4 растений *Nicotiana benthamiana*, в различные зоны листа с помощью шприца без иглы (рис. 1).

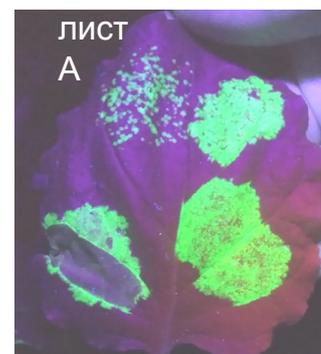
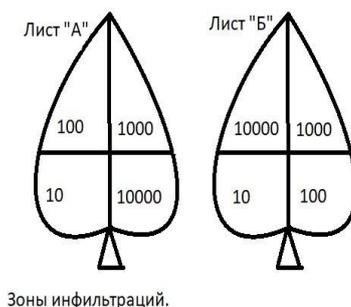


Рисунок 1. Инфилтрация. Схема инфилтрации. Лист в УФ свете на 6 день. Сбор проб проводился на 4 день после агроинфилтрации. Всего 16 проб, 4 листа, с каждого листа по 4 пробы (высечек). Названия проб: А(тип инфилтраций); 1 (номер растения); 1 тип инфилтрации. Пример: А;1-1.

На 4 день (спустя 3 полных суток) сняты пробы с 1 – 4 растений, номера 5 и 6 были оставлены для дальнейшего наблюдения и производства белка. Добавлена пробирка -К (отрицательный контроль, материал, собранный с незараженного листа). Собраны только концентрации 10 – 1000 раз, так как использовался «сильный» вектор, и концентрация разведения высока, вследствие чего ожидается высокий выход белка. (Пробы с разведением в 10 тыс. были сняты на 11 день, 31 октября 2017 г.)

5 и 6 номер были оставлены для того, чтобы увидеть, как себя поведёт растение с течением времени в различных зонах инфилтрации.

Отрицательный контроль — проба с неинфилтрированного участка.

Для того, чтобы возможно было измерить количество GFP необходимо получить экстракт:

- Растереть пробы с целитом (абразивным порошком).
- Добавить буфер для экстракции GFP (300 мкл)
- Центрифугировать 10 минут при 14 тысячах оборотах в минуту для осаждения нерастворимых компонентов.
- 280 мкл из полученного экстракта переместить в кювету для измерения на флуориметре, добавив 720 мкл буфера.

Количество GFP было измерено за счёт флуоресценции. Флуоресценция GFP была измерена с помощью флуориметра, который возбуждает свечение GFP светом с длиной волны 390 нм, а улавливает флуоресценцию в диапазоне 490-520 нм, который соответствует пику флуоресценции GFP. Для этого используются фильтры типа “narrowband” (NB 390 нм и NB 520 нм).

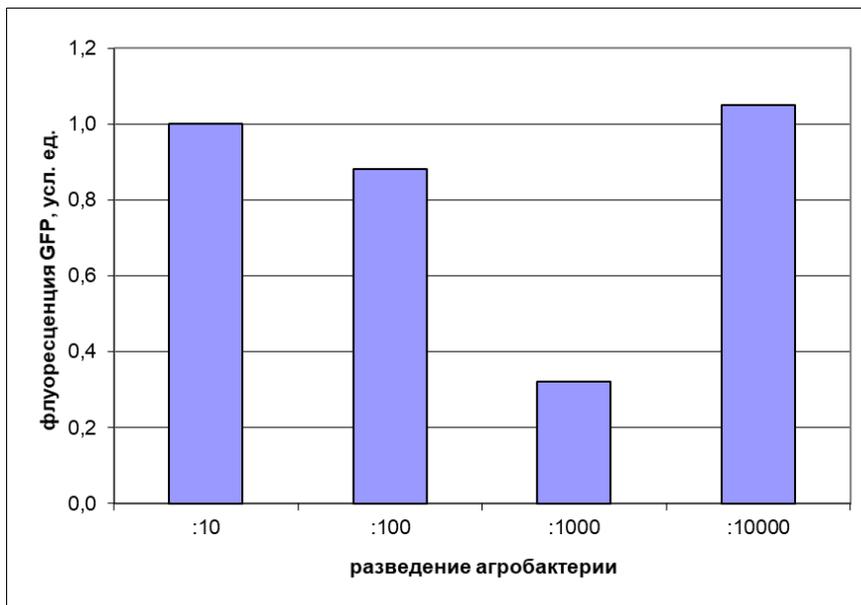
Желтым обозначены мутные образцы, которые могли быть неверно измерены. В таблице приведена абсолютные значения, полученные с прибора.

	Раст.	Раст.	Раст.	Раст.
--	-------	-------	-------	-------

	№ 1	№ 2	т. № 3	№ 4
В 10 р.	190	90	11 6	200
В 100 р.	95	150	55	178
В 1000 р.	78	35	23	76
В 10000 р.	190	30	50	220

Для того, чтобы можно было сравнивать листья между собой, провели нормировку на значение, которое дает первое разведение (в 10 раз), а затем определили относительные средние значения по 4 растениям (см. таблицу и график ниже).

	Рас т. № 1	Рас т. № 2	Рас т. № 3	Рас т. № 4		среднее (без учета мутных)
В 10 р.	1,0	1,0	1,0	1,0	: 1 0	<b>1,0</b>
В 100 р.	0,5	1,7	0,5	0,9	: 1 0 0	<b>0,9</b>
В 1000 р.	—	0,4	0,2	0,4	: 1 0 0 0	<b>0,3</b>
В 10000 р.	1,0	—	—	1,1	: 1 0 0 0 0	<b>1,1</b>
<b>нормировка на первое разведение (в 10 раз)</b>						



Из этой части эксперимента следует, что для модельного белка GFP можно использовать высокие разведения суспензии агробактерии, т.к. используемый «сильный» вектор обеспечивает достаточный уровень продукции. Исходя из полученных результатов выгоднее использовать низкие концентрации, это доказывает уровень продукции при разведении в 10 тысяч, который сравним или выше, чем уровень продукции при разведении в 10 раз. Кроме того, на 11 день после инфильтрации на некоторых листьях даже при разведении в 10 тысяч появились некрозы, а при более высокой плотности суспензии наблюдались некрозы во всех случаях. Скорее всего, некрозы возникают за счет стремительного накопления большого количества чужеродного белка в клетке. При более высоких разведениях (низкой плотности суспензии) достигается такой же уровень продукции, но за более длительное время. Таким образом, предположения насчёт модельного белка оказались верны, но неожиданностью стало то, что результат при разведении в 10000 оказался сравним или даже выше, чем при разведении в 10 раз.

#### ЭКСПЕРИМЕНТ С ИММУНОГЛОБУЛИНОМ G

Иммуноглобулин — крупный, сложный многокомпонентный белок, а значит растению будет сложнее производить его, и это будет намного затратнее по времени. Скорее всего, количество наработанного белка будет прямо пропорционально разведению.

Для получения иммуноглобулина (рис. 2) необходимо ввести в клетку два гена: ген легкой цепи и ген тяжелой цепи. Для этого используются 2 бактерии: с плазмидами, одна из которых содержит ген легкой цепи, другая – тяжелой. Здесь использовались также как и в случае с GFP вирусные векторы, способные мультиплицироваться в клетке (векторы 11520 и 11333, тяжёлая и лёгкая цепь соответственно). Агробактерия с высокой вероятностью агробактерия обе цепи доставит в одну клетку, где они будут собраны растением. Перед тем, как ввести суспензию в лист, векторы (количество бактерий в суспензиях примерно одинаково) смешивают, и только потом вводят в лист.

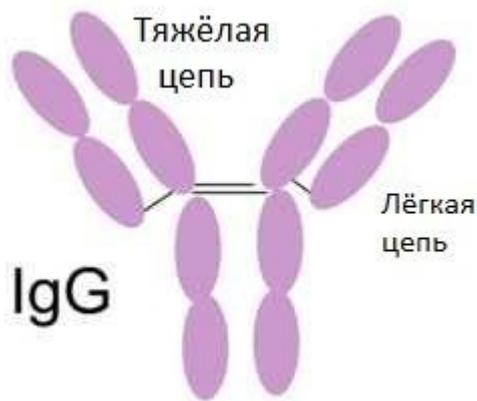


Рис. 2. Схематическое изображение иммуноглобулина G. Тетрамер, состоящий из двух легких и двух тяжелых цепей, соединенных между собой –S-S- связями (обозначены линиями).

Оптическая плотность каждой ночной культуры бактерий была измерена 29 ноября, и смешана в пропорции 1 к 1, затем введена в растение. Плотность колоний составляла 0,31 вектора 11520 и 0,32 вектора 11333.

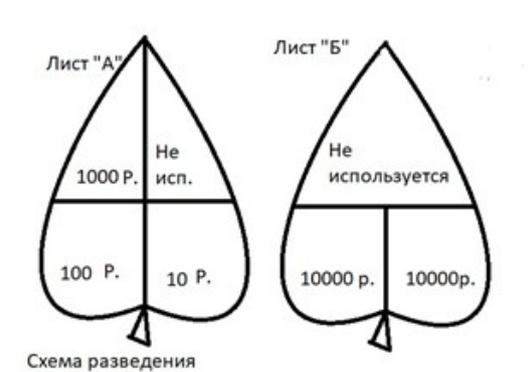


Рисунок 3. Схема инфильтрации смесью векторов 11520 и 11333 для продукции иммуноглобулина G.

На рисунке 3 приведена схема инфильтраций для иммуноглобулина. Всего 6 листьев типа А и 4 листа типа Б. А (тип размещения инфильтрации); 1 (тип инфильтрации), 1 (номер растения). Пример обозначения пробы: А; 1 – 1

Через 6 полных суток, 5 декабря были собраны и заморожены пробы с листьев «А». Были подготовлены экстракты и заморожены. Ещё через 2 дня собрана первая часть проб с листьев «Б». Заморожена цельными высеками. На следующий день собрана вторая часть проб с листьев «Б». Пробы были собраны в разные дни, так как из-за малого количества бактерий в суспензии было не ясно, будет ли получен хороший результат, как в случае GFP, или будет ли он получен в принципе.

Для того, чтобы подготовить экстракт для анализа накопления иммуноглобулина необходимо:

- растереть высеку из инфильтрированной зоны листа растения с целитом (абразивным порошком)
- добавить буфер 1×PBS (50 мкл)
- центрифугировать 10 минут при 14 тысячах оборотов

- перенести 50 мкл экстракта в пробирку с 25 мкл 4× буфера для нанесения, содержащего краситель, глицерин и детергент.

- прогреть пробы на 95° в течение 5 мин. После этого можно наносить пробы в гель или заморозить на -20°.

Подготовленные пробы были занесены в полиакриламидный гель (ПААГ). 23 декабря, для того чтобы определить количество иммуноглобулина. Т.к. на гель наносят маркёры (белки известной массы и подвижности, ориентируясь на положение которых можно оценить положение исследуемого белка в геле), а также экстракт из незараженного листа, то можно с уверенностью определить зону, соответствующую иммуноглобулину после электрофореза и окраски геля Кумасси.

Подготовка и проведение электрофореза в ПААГ:

- Необходимо залить ПААГ между 2 специальными стёклами и дать ему время застыть. Использовали 7,5% гель, подходящий для анализа крупных белков.

- Когда ПААГ застынет, нужно промыть лунки для проб и внести сами пробы.

- В прибор можно поместить от одного до 4 гелей для одновременного проведения электрофореза, само разделение белков в геле происходит за счет воздействия электрического тока и наличия специального буфера для белкового электрофореза в приборе.

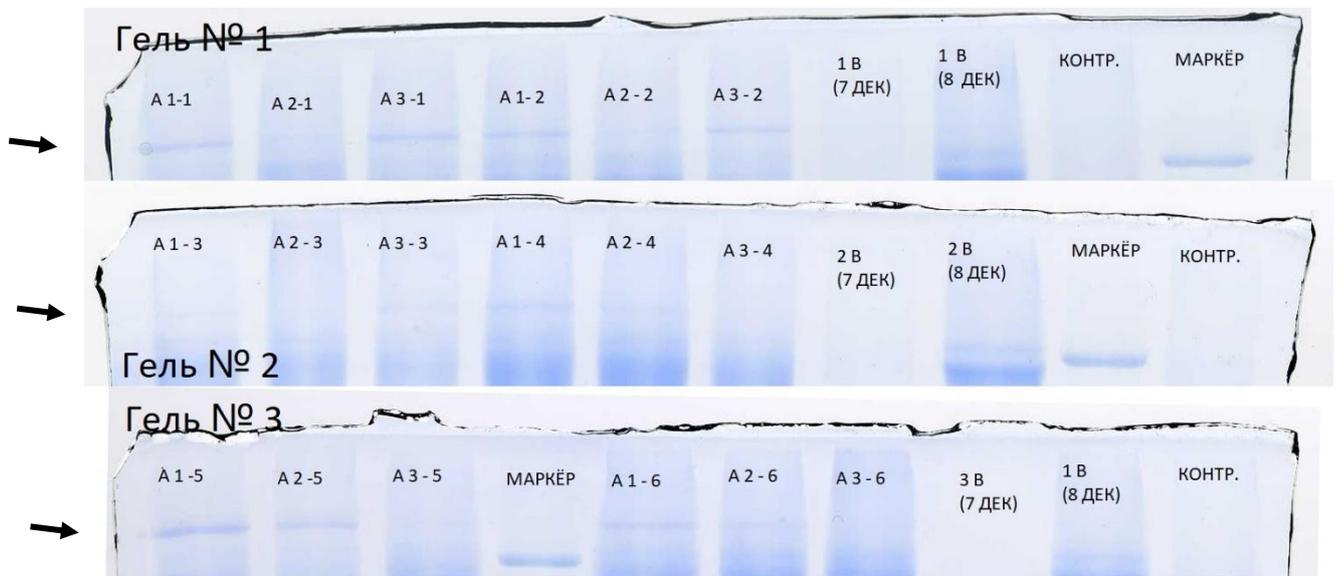
- Сила тока выставляется из расчета 10-15 мА на один гель. Процесс занимает примерно 1,5 часа.

- Когда электрофорез завершится, промыть гель и поместить в ёмкость с раствором красителя Кумасси в воде с добавлением этанола и уксусной кислоты. Происходит специфическое окрашивание белков и неспецифическое – самого геля. Для того чтобы удалить краску с геля, необходимо прокипятить гель в дистиллированной воде, сменив воду 2-3 раза.

- Отсканировать гель, переводя его в цифровое изображение.

- Выделить зону, соответствующую иммуноглобулину в программе ImageJ, провести расчет количества пикселей в выбранной зоне.

Фото ПААГ после электрофореза. Самые верхние полосы — иммуноглобулин (обозначены стрелкой).



Ниже представлена таблица значений иммуноглобулина в абсолютных значениях. Растения №1-3 не будут учитываться в дальнейших расчётах, так как дали отклоняющиеся от ожидания результаты, хотя другая половина растений дала логичные и ожидаемые.

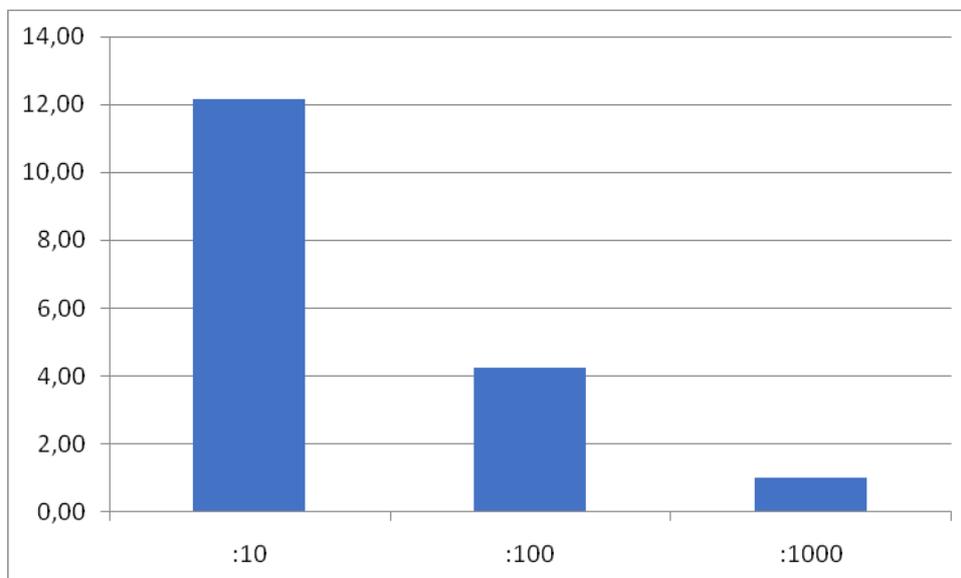
	1	1	1
	0	0	0
	р	р	р
	а	а	а
	з.	з.	з.
Р	2	6	2
а	9	5	5
с	4	9	9
т.	0		5
№			
1			
Р	2	8	1
а	4	5	7
с	2	1	7
т.	5		2
№			
2			
Р	7	1	1
а	6	1	3
с	8	0	3
т.			2
№			
3			

3			
Р а с т. № 4	3 0 6 0	7 5 9	1 5 5
Р а с т. № 5	5 2 3 9	2 5 1 7	4 9 0
Р а с т. № 6	1 6 6 7	7 5 1	2 7 8

Подобные результаты могли быть получены из-за того, что растения ранее использовались для других экспериментов в лаборатории, и с расположением места инфильтрации, так как в верхней части листа наработка белка всегда идёт лучше, чем в нижней. Результаты этих растений в таблицу включены не будут.

	В 10 раз.	В 100 раз.	В 1000 раз
4	19,74	4,90	1,00
5	10,69	5,14	1,00
6	6,00	2,70	1,00
сре дне е	12,14	4,24	1,00

Таблица в условных значениях.



Относительный уровень накопления иммуноглобулина.

Данные таблицы для растений 4 – 6 подтверждает предположение о том, что количество белка прямо пропорционально разведению агробактерии.

В итоге для производства целевого белка иммуноглобулина требуются большие концентрации агробактерии и больше времени, чем для GFP, причём разведение в 10000 не дало видимых результатов, так как концентрация бактерий слишком низкая. То, что высечки, собранные 7 декабря, были заморожены, не играет роли, т.к. собранные 8 декабря и замороженные уже экстрактом пробы также не дали результатов.

## ВЫВОД

Эксперимент показал, что в случае такого сложного и крупного белка, как иммуноглобулин G, необходимы высокие концентрации разведения, и более высокую плотность бактерии, чем для модельного белка GFP, так как иммуноглобулин в 5 раз больше чем GFP, и растению гораздо сложнее его вырабатывать, в следствие чего эффективность наработки GFP выше, чем у иммуноглобулина.

Для GFP можно использовать очень низкие концентрации разведения, и проблем с наработкой белка не будет, вопрос лишь во времени. По графику становится видно, что разведение в 10 тысяч дало больший результат, чем разведение в 10. При разведении в 10 раз мы получили результат через 3 полных дня, но при разведении для того же результата понадобилось 10 полных дней, но даже при такой концентрации на некоторых листах появились некрозы, на тот же день при разведении в 10 раз некрозы сгубили всю зону инфильтрации.

Таким образом, для целевого GFP и модельного иммуноглобулина необходимы разные условия, и условия для GFP — разведение в 10000 раз и 11 дней на наработку большого количества белка, не подходят для иммуноглобулина, условия которого — 6 полных суток и разведение в 10 раз.



## ЛИТЕРАТУРА

- Ганс-Вальтер Хелдт, «Биохимия Растений», страницы 437– 462
- М. Сингер, П. Берг, «Гены и геномы 1», страницы 196–207, 214–218, 228 – 236, 286 – 292
- Растения-Биофабрики <https://biomolecula.ru/articles/rasteniia-biofabriki>  
Статья про клонирование <https://biomolecula.ru/content/961>
- Журнал «Наука и жизнь» (2015) выпуск № 6, статья «От клеточной биологии — до клеточной терапии»