

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-72

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ^{*}

DEVELOPMENT OF RECOMBINANT PROTEINS OF PLANT VIRUSES

А. А. Десяткин¹, Н. В. Блажко¹, С. Х. Вышегуров², А. Ю. Величко¹

¹Научно-исследовательский центр «Иновации», Новосибирск

²Новосибирский государственный аграрный университет

A. A. Desyatkin¹, N. V. Blazhko¹, S. H. Vishegurov², A. Y. Velichko¹

¹Research Center “Innovations”, Novosibirsk

²Novosibirsk State Agrarian University

✉ bnv@nic-innovations.ru

Аннотация

Для выявления вирусных заболеваний растений требуются быстрые и точные методы диагностики возбудителей. Одним из таких методов выявления фитопатогенов является иммунохимический. Ключевыми компонентами для разработки отечественных иммунохимических тест-систем являются рекомбинантные вирусные белки, сохраняющие структурные и функциональные свойства вирусных аналогов.

Abstract

Prevention of viral diseases requires fast and accurate methods for detecting viral pathogens. One of the fast and accurate methods for detecting plant viral pathogens is immunochemical methods. Key components for the development of domestic immunochemical test systems are recombinant viral proteins that retain the structural and functional properties of viral analogues.

В настоящее время большинство сельскохозяйственных культур находится под угрозой различных вирусов, вызывающих заболевания растений. Растительные вирусы наиболее часто представлены одно- и двухцепочечными РНК-вирусами, одноцепочечными и ретроидными ДНК-содержащими вирусами [1]. Такие вирусы состоят из молекулы нукleinовой кислоты и защитной белковой оболочки (капсида) [2].

Вирусы вызывают множество экономически значимых заболеваний растений по всему миру. Заболевания растений в некоторых случаях могут приводить к потере урожайности до 98 %, а также снижению качества сельскохозяйственных культур [3, 4]. При этом отдельные представители вирусов растений способны инфицировать более 1000 разных видов растений из более 85 семейств [5].

Таким образом, профилактика вирусных заболеваний требует быстрых и точных методов обнаружения вирусных возбудителей. В настоящее время для диагностики заболеваний используют методы визуальной диагностики. Однако для точного определения заболеваний растений необходимо использовать иммунохимические методы и методы, основанные на ДНК- и РНК-технологиях [5].

Наиболее часто в иммунохимических методах используют моно-поликлональные препараты антител животного происхождения, полученные после иммунизации вирусным препаратом. Однако получение и работа с вирусными препаратами могут быть отягощены возможностью кросс-контаминации родственным вирусом, что может оказаться на специфичности полученных антител.

Поэтому целью нашей работы было получение функциональных рекомбинантных антигенов таких вирусов растений, как CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*), PepMV (*Pepino mosaic virus*), ToBRFV (*Tomato brown rugose fruit virus*), TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), которые в дальнейшем можно будет использовать для разработки отечественных диагностических систем вирусов растений.

Для этого были отобраны листья зараженных растений, из которых выделяли РНК (CGMMV, PepMV, ToBRFV) и ДНК (TYLCV). Генетический материал выделяли при помощи TRIzoll (Thermo Fisher Scientific, США), с последующим проведением ОТ-ПЦР/ПЦР для амплификации гена, кодирующего капсидный белок. В олигонуклеотиды для амплификации были добавлены уникальные сайты эндонуклеаз рестрикции BamHI и CciNI (СибЭнзим, Россия). В качестве вектора была использована экспрессионная плазмида системы pET. Кло-

* Исследование выполнено за счет средств областного бюджета Новосибирской области. Субсидия субъекту инновационной деятельности на финансовое обеспечение затрат в связи с выполнением работ по подготовке, осуществлению трансфера и коммерциализации технологий, включая выпуск опытной партии продукции, ее сертификацию, модернизацию производства и прочие мероприятия (0000005406995998245120822/№Т-56).

нирование генов, кодирующих капсидные белки в состав экспрессионного вектора, проводилось при помощи уникальных сайтов рестрикции по общепринятым методикам и рекомендациям производителя «СибЭнзим». Целостность рамки считывания определяли при помощи секвенирования по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск).

Рекомбинантные белки нарабатывали в бактериях *E. coli* штамма BL21(DE3) с добавлением IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ и культивированием в течение 16 ч. Очистку белков проводили с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-IMAC сефарозы (GE Healthcare). Контроль целевых белков проводили при помощи электрофоретического разделения белков в денатурирующих условиях в 12%-м полиакриламидном геле по методу Лэмбли [6]. Выход целевого белка с 1 л культуры составлял более 50 мг с чистотой не менее 90 %. Оценку функциональности рекомбинантных белков осуществляли при помощи коммерческих наборов Agdia (США). В результате оценки коммерческие системы способны выявлять рекомбинантные белки в растворе в количестве менее 1 мкг/мл.

В результате были получены рекомбинантные белки, которые можно использовать для иммунизации животных и получения в дальнейшем коньюгатов антител, для производства отечественной тест-системы для выявления вирусов растений.

Литература

1. Koonin E. V., Senkevich T. G., Dolja V. V. The ancient Virus World and evolution of cells // Biology Direct. 2006. Vol. 1. P. 1–29.
2. Gergerich R. C., Dolja V. V. Introduction to plant viruses, the invisible foe // The Plant Health Instructor. 2006. Vol. 478.
3. Pennazio S., Roggero P., Conti M. Yield losses in virus infected crops // Phytopathology and Plant Protection. 1996. Vol. 30, No. 4. P. 283–296.
4. Czosnek H., Laterrot H. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses // Archives of Virology. 1997. Vol. 142, No. 7. P. 1391–1406.
5. Nazarov P. A., Baleev D. N., Ivanova M. I. et al. Infectious plant diseases: etiology, current status, problems and prospects in plant protection // Acta Naturae. 2020. Vol. 12, No. 3. P. 46–59.
6. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.