

**ОТРИМАННЯ КУЛЬТУРИ ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ ТА РОСЛИН ТЮТЮНУ ТА М'ЯТИ, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ РЕКОМБІНАНТНИЙ ГЕН ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА**

**Ситник К.О.**

**Київський палац дітей та юнацтва, [katiasytnyk@gmail.com](mailto:katiasytnyk@gmail.com)**

Інтерферон альфа - це лейкоцитарний секреторний білок неспецифічного імунітету людини, який сьогодні широко використовується для лікування гепатитів, ГРВЗ, лейкозу, деяких типів раку, тощо. Станом на теперішній час білок інтерферону в промисловості отримують у культурах тваринних (Hamster Ovary Cells) і бактеріальних (*Escherichia coli*) клітин. Альтернативою цих методів є накопичення цього білку в рослинних культурах. Такий метод вважається безпечнішим, адже отриманий препарат не потребує додаткової очистки від можливої контамінації бактеріальними токсинами чи тваринними вірусами і пріонами, а також набагато спрощує отримання білку (немає потреби у вартісних системах культивування чи посттрансляційних модифікаціях) і зберігання білку (трансформовані рослини не потребують спеціальних холодильників і жорсткого температурного режиму).

Одним з найменш затратних рослинних систем для отримання рекомбінантних фармацевтичних білків вважають культуру трансгенних коренів, що пов'язано з: 1) швидким приростом біомаси та відсутністю геотропізму цієї культури; 2) низькою собівартістю культивування (культура Рі-коренів не потребує постійного освітлення, немає необхідності в дорогих живильних середовищах). На сьогодні ми знайшли лише поодинокі повідомлення щодо ініціації культури трансгенних коренів шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації з метою експресії інтерферону альфа.

Метою представленої роботи є отримання культури трансгенних коренів та рослин тютюну та м'яти, що містять ген рекомбінантного інтерферону альфа 2b злитого з *his-tag* послідовністю, що дозволить очистити цільовий білок (за необхідністю) методом афінної хроматографії з метою подальшого вивчення його антивірусних та протиракових властивостей.

Векторні конструкції pNPB0030 та pNPB0029, що містили цільовий ген інтерферону альфа (*HuINFa-2b*), злитий з кальретикуліновим сигналом таргетингу в апопласт і *his-tag* послідовністю, та селективний ген *nptII* або селективний ген *bar*, були люб'язно надані Інститутом клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Бактеріальні клітини *Agrobacterium rhizogenes* (штам А4) було трансформовано методом теплового шоку. Присутність цільового гену інтерферону (*HuINFa-2b*) в отриманій культурі агробактерій перевіряли за допомогою ПЛР-аналізу, який підтвердив наявність цільового *HuINFa-2b* у досліджуваних бактеріальних колоніях. Згодом отриману культуру бактерій було використано для трансформації рослин тютюну та м'яти перцевої.

Для отримання суспензійної бактеріальної культури *Agrobacterium rhizogenes* (штам А4), використовували рідке середовище LB, яке містило 50 мг/л карбеніциліну. Культивували на орбітальному шейкері при постійному перемішуванні (200 об./хв.) за температури 28°C. модельні рослини тютюну піддавали агробактеріальній трансформації шляхом інокуляції листкових дисків бактеріальною культурою. Через 2 доби трансформовані експланти переносили на середовище MS із додаванням цефатоксиму (500 мг/л) та канаміцину (100 мг/л) або 10 мг/л селективного гербіциду фосфіотрицину в умовах кімнатної температури і постійного освітлення. У зв'язку з тим, що тютюн не вживають в їжу через значний вміст алкалоїдів, рослини *Nicotiana tabacum* L було використано лише як модельні з метою аналізу особливостей синтезу рекомбінантного білку. ПЛР-аналіз дозволив підтвердити присутність цільового *HuINF $\alpha$ -2b* генів для 90-100% досліджуваних рослин, крім того, аналіз підтвердив відсутність бактеріального забруднення (*virD1*) для всіх досліджуваних рослин. Аналіз антивірусної активності екстрактів отриманих культур показав активність на рівні 640 до 2560 МО/г СВ. Тому проводили також генетичну трансформацію лікарської рослини - м'яти перцевої *Mentha piperita* L - з метою отримання рослин, що, окрім вмісту білку інтерферону, характеризувалися би седативною і протизапальною дією.

*Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованій трансформації за загальноприйнятою методикою піддавали гіпокотильні проростки м'яти. Через 2 доби трансформовані експланти переносили на тверде середовище MS. Через 7-10 днів на гіпокотильних експлантах було помічено ініціацію "бородатих" коренів. Надалі експланти було перенесено на середовище MS із додаванням 5 мг/л фосфіотрицину в якості селективного агента і поступово збільшували до концентрації 10 мг/л. Рослини м'яти регенерували на селективних середовищах із додаванням 1 мг/л регулятора росту бензипамінопурину. Отримані рослини не характеризувалися Rі-фенотипом і протягом 1-2 тижнів укорінювалися на селективному середовищі без додавання регуляторів росту. Згодом було виділено ДНК отриманих рослин м'яти за допомогою ЦТАБ-методу і проведено аналіз методом ПЛР, що підтвердив присутність цільового гену *HuINF $\alpha$ -2b* для 25% аналізованих рослин.

Надалі плануємо проведення аналізу методом ПЛР пов'язаною зі зворотною транскрипцією, визначення антивірусної та антипроліферативної активності екстрактів отриманих трансгенних рослин м'яти.