

Введение в генную инженерию растений

- **Производство чужеродных белков в растениях**
- Растения можно использовать для производства чужеродных белков, в том числе медицинского назначения
- Клетки растений биологически безопасны, они не содержат патогенных для человека вирусов и прионов
- Нарabотка целевых белков в растениях не требует применения дорогостоящей аппаратуры и культуральных сред, а также поддержания системы стерильности
- Стоимость выращивания исходных опытных растений значительно ниже стоимости культивирования клеток бактерий, дрожжей или животных

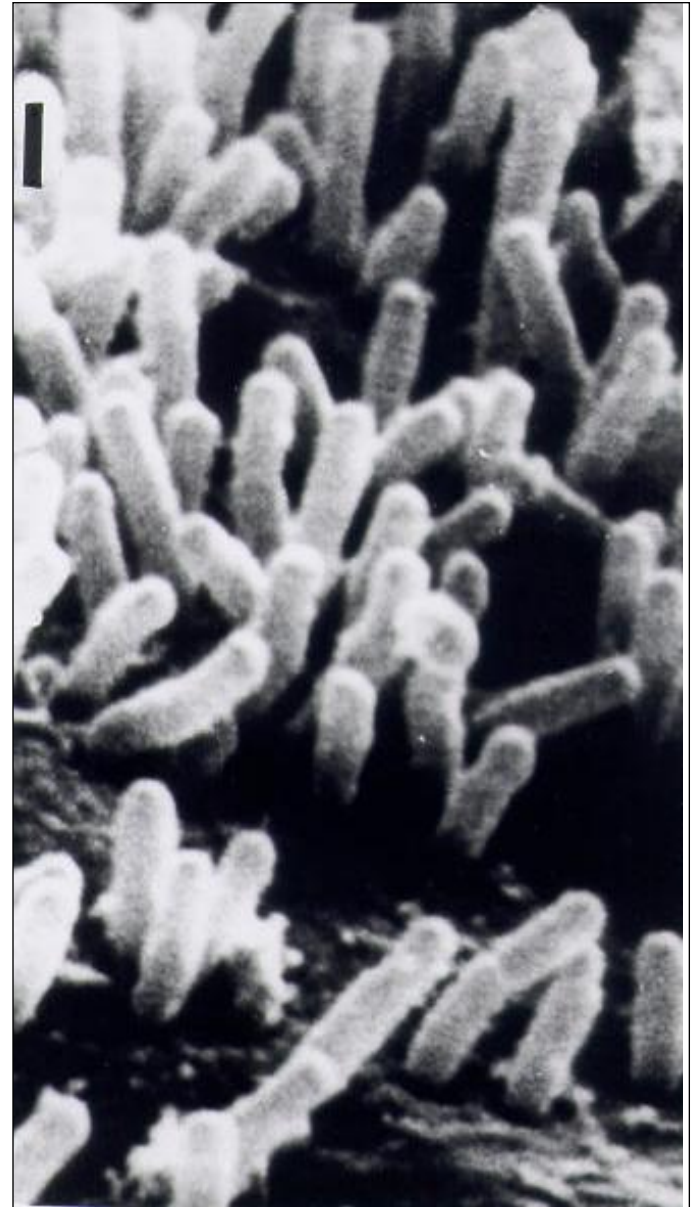
- **«Съедобные» вакцины**

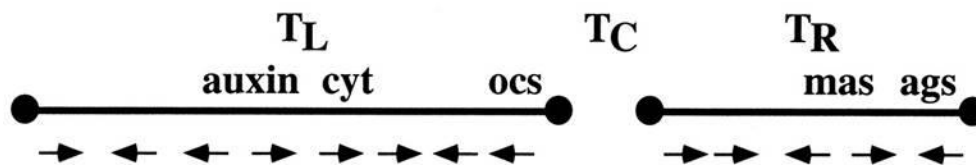
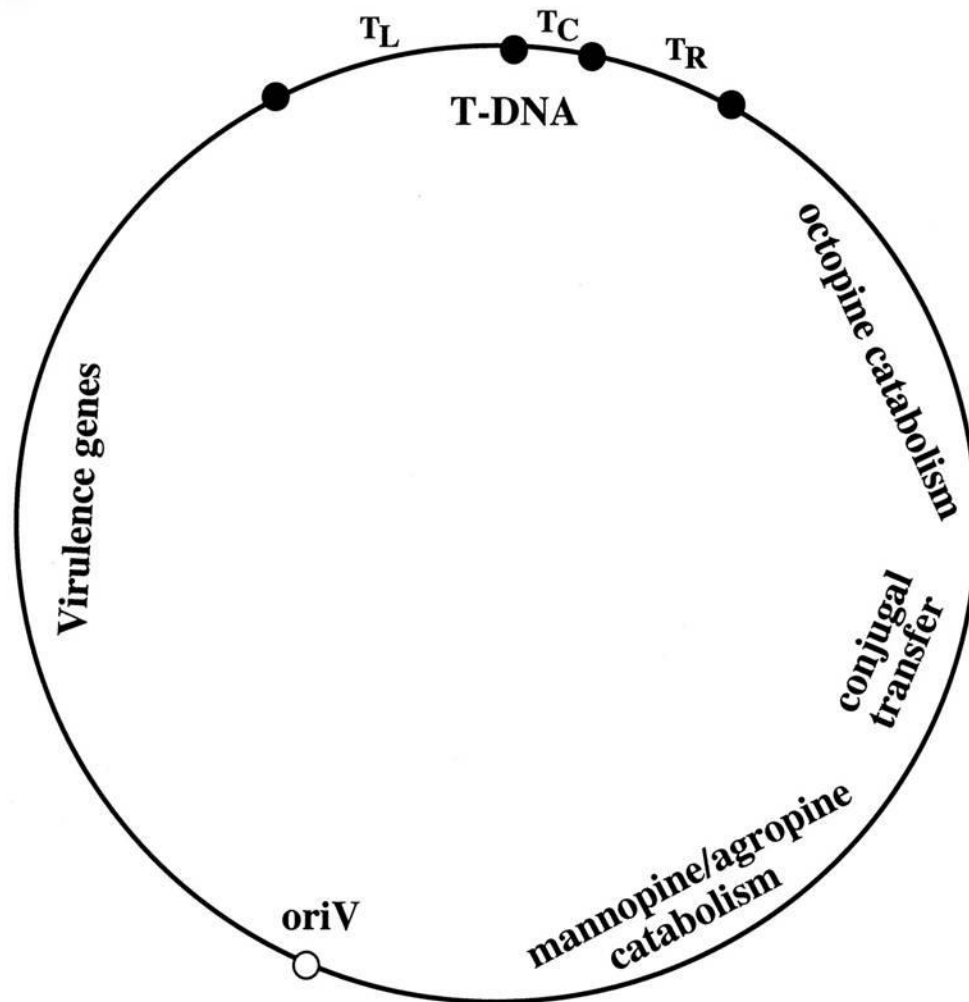
- Например, на людях успешно тестировали следующие вакцины, направленные против:
- Энтеротоксичного штамма *E.coli* (картофель, кукуруза)
- Вируса Норфолка (картофель)
- Вируса гепатита В (салат, картофель)
- Вируса бешенства (шпинат)

- **Трансгенные растения - стабильная ядерная трансформация**
- Низкий уровень продукции белка (0,01-0,2%)
- Создание трансгенных растений занимает много времени
- Практическое использование осложняется из-за государственных ограничений и требований биобезопасности

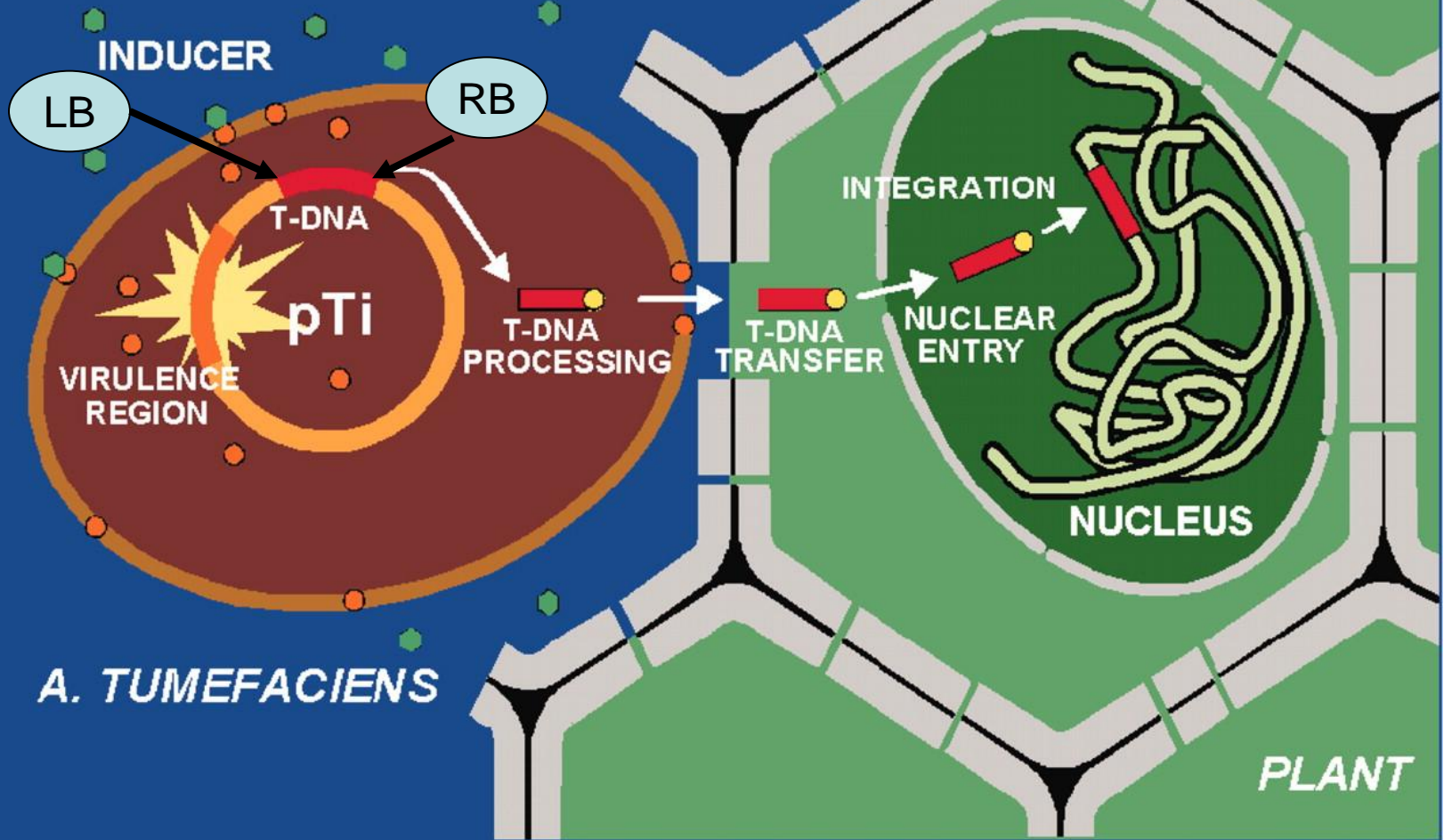
Agrobacterium tumefaciens

- Патоген растений
- Вызывает образование опухолей (корончатый галл)
- Основную роль в процессе трансформации играет **Ti-плазмида**
- В растительный геном интегрируется особый участок **Ti-плазмиды - T-ДНК**
- В результате экспрессии генов, кодируемых **T-ДНК**, происходит:
 - сверхпродукция растительных гормонов роста
 - синтез опинов

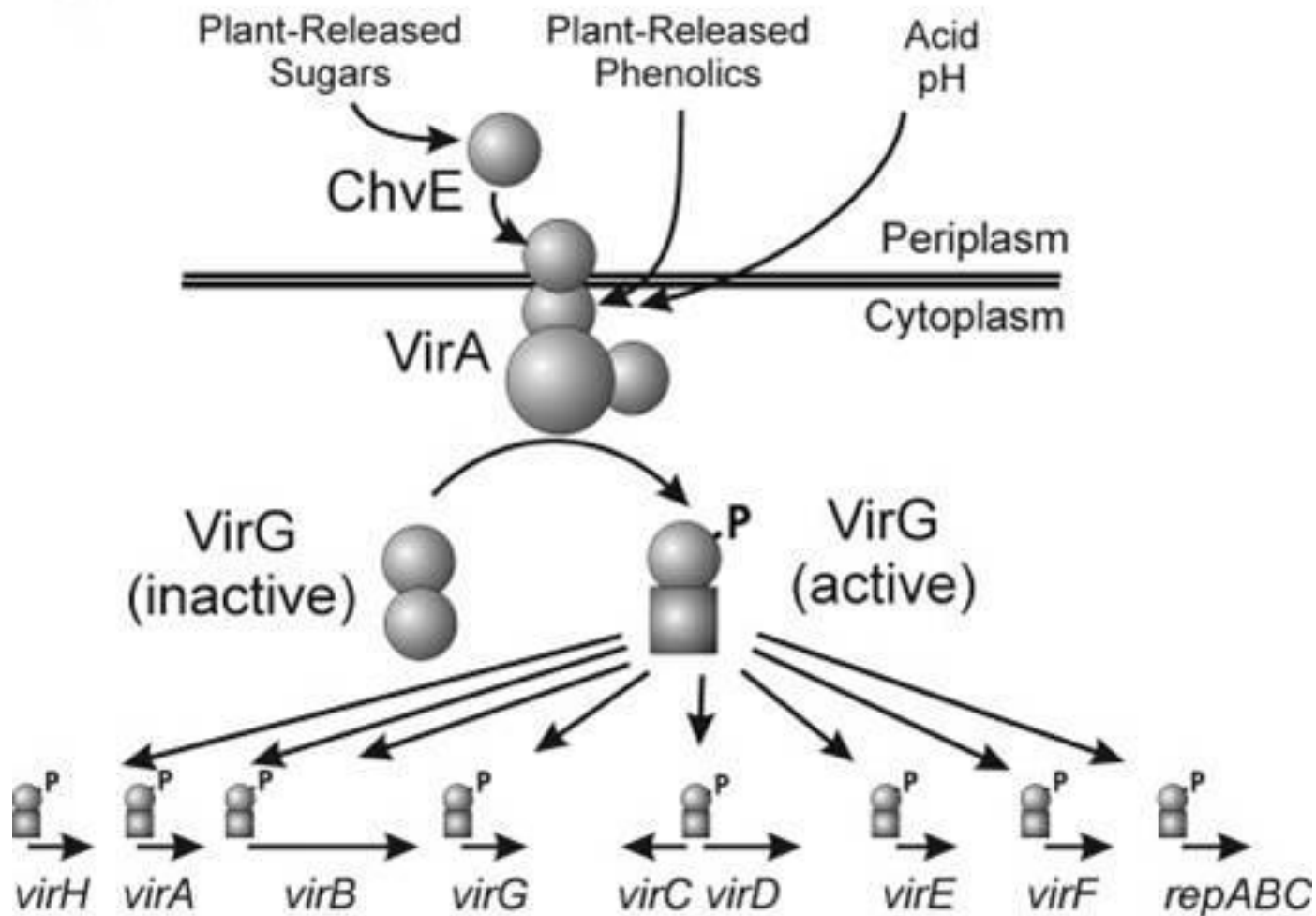




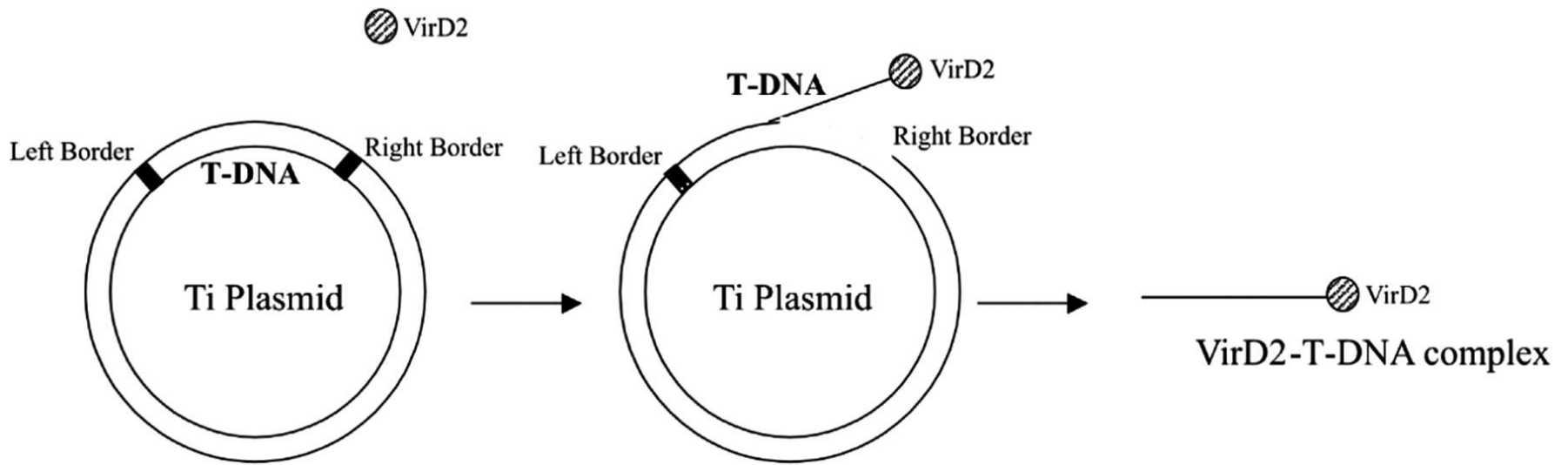
PASSAGE OF T-DNA FROM AGROBACTERIUM INTO PLANT NUCLEAR DNA



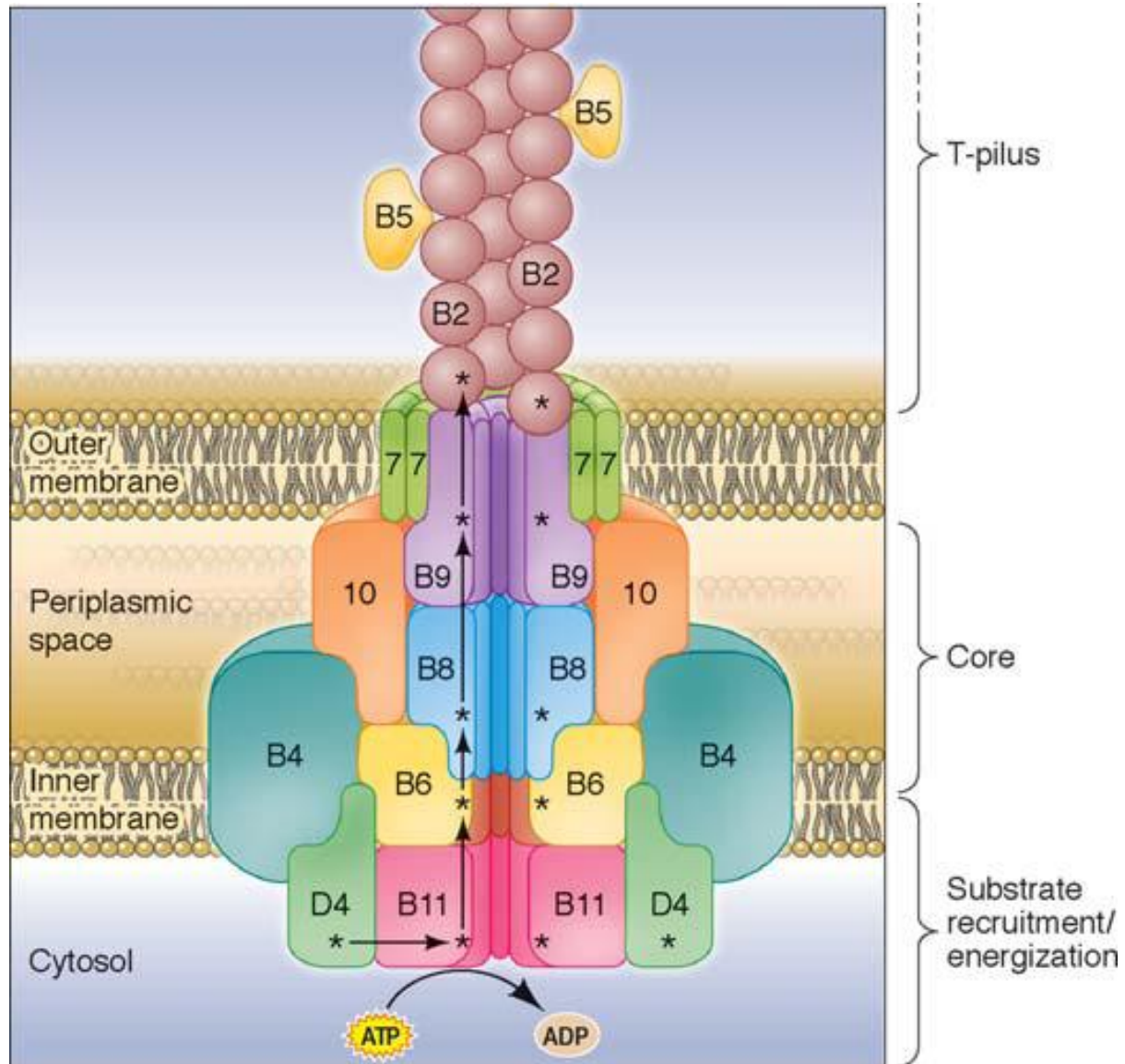
Активация *vir*-генов



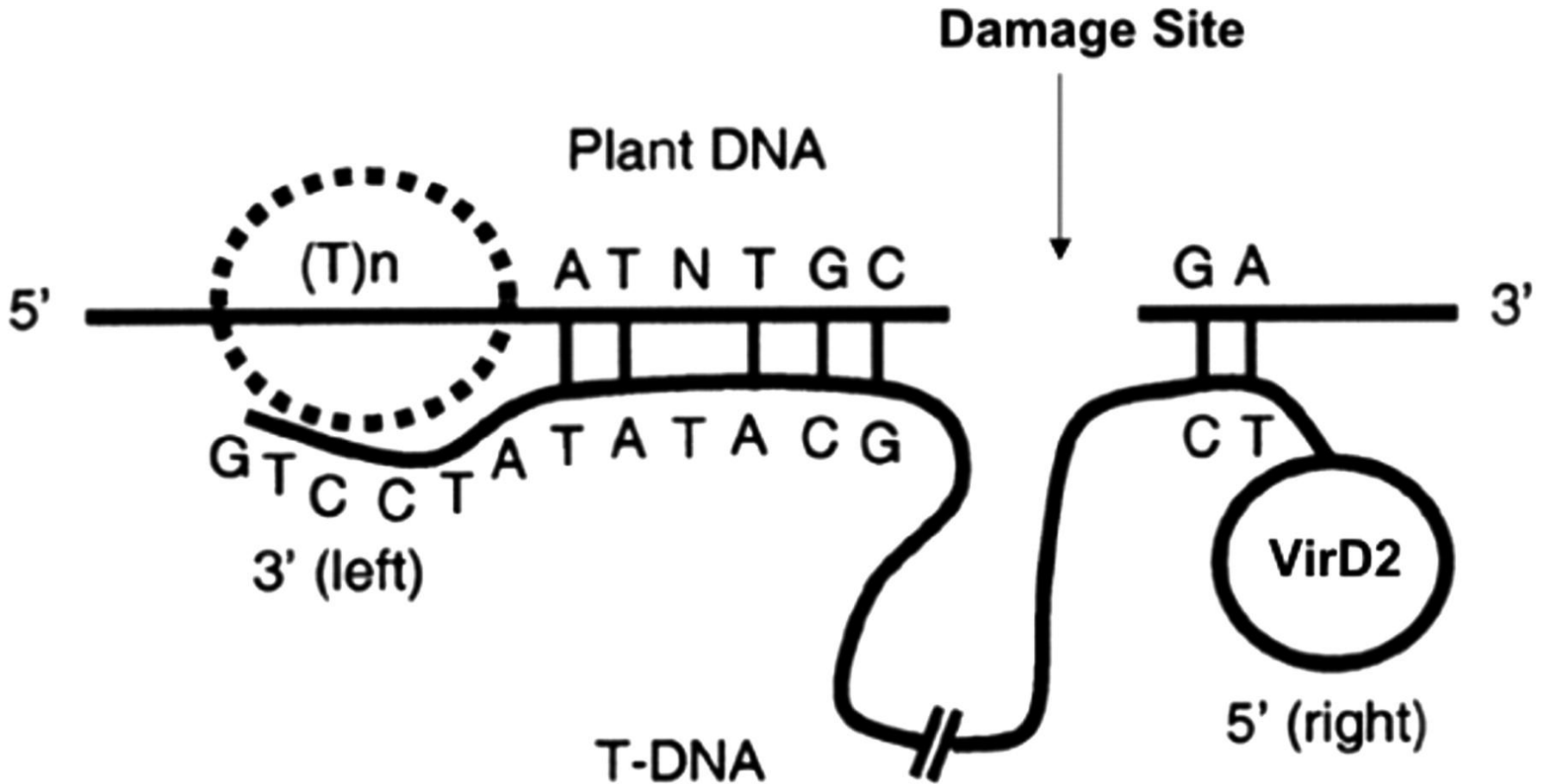
Процессинг Т-ДНК

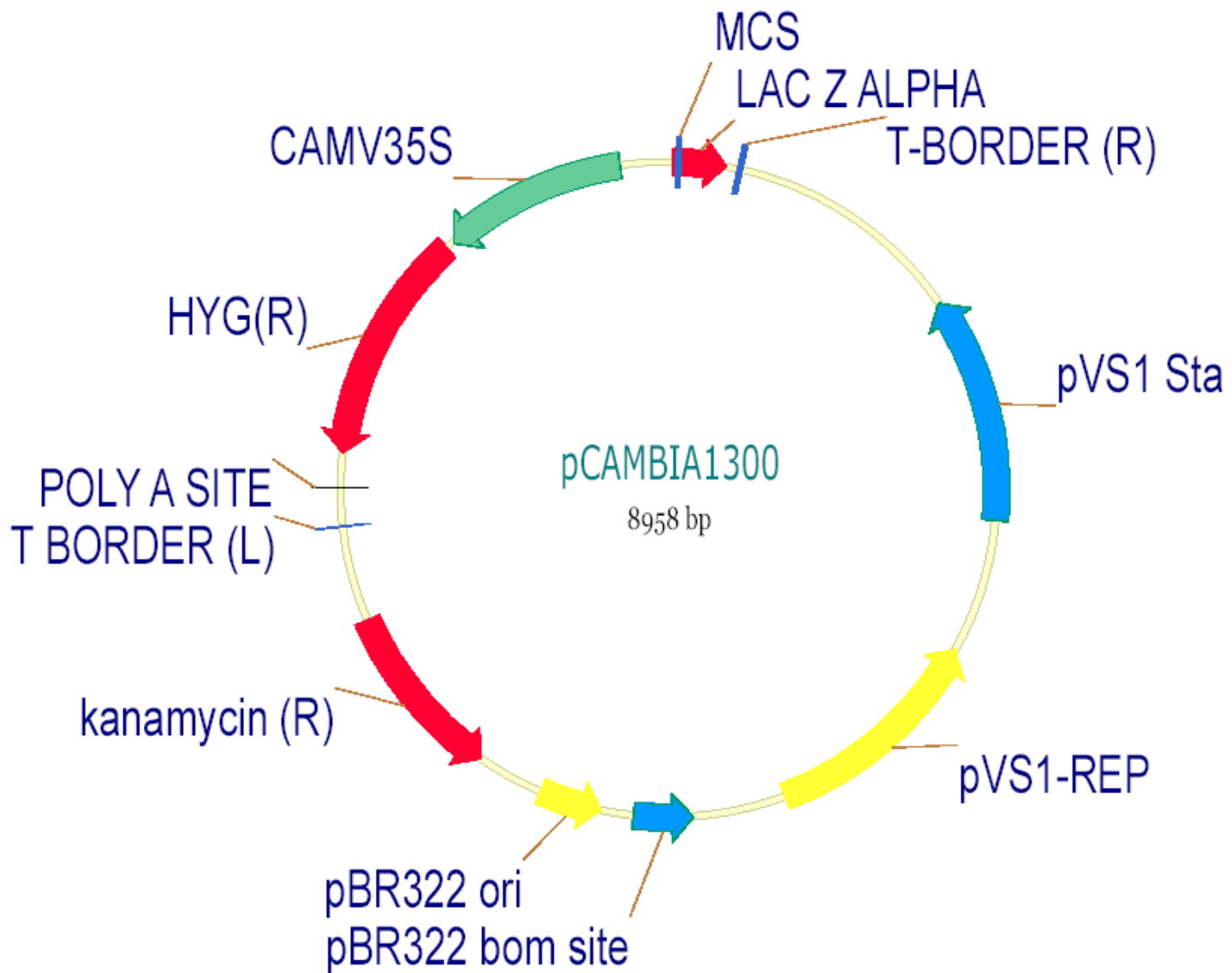


Секреция Т-ДНК

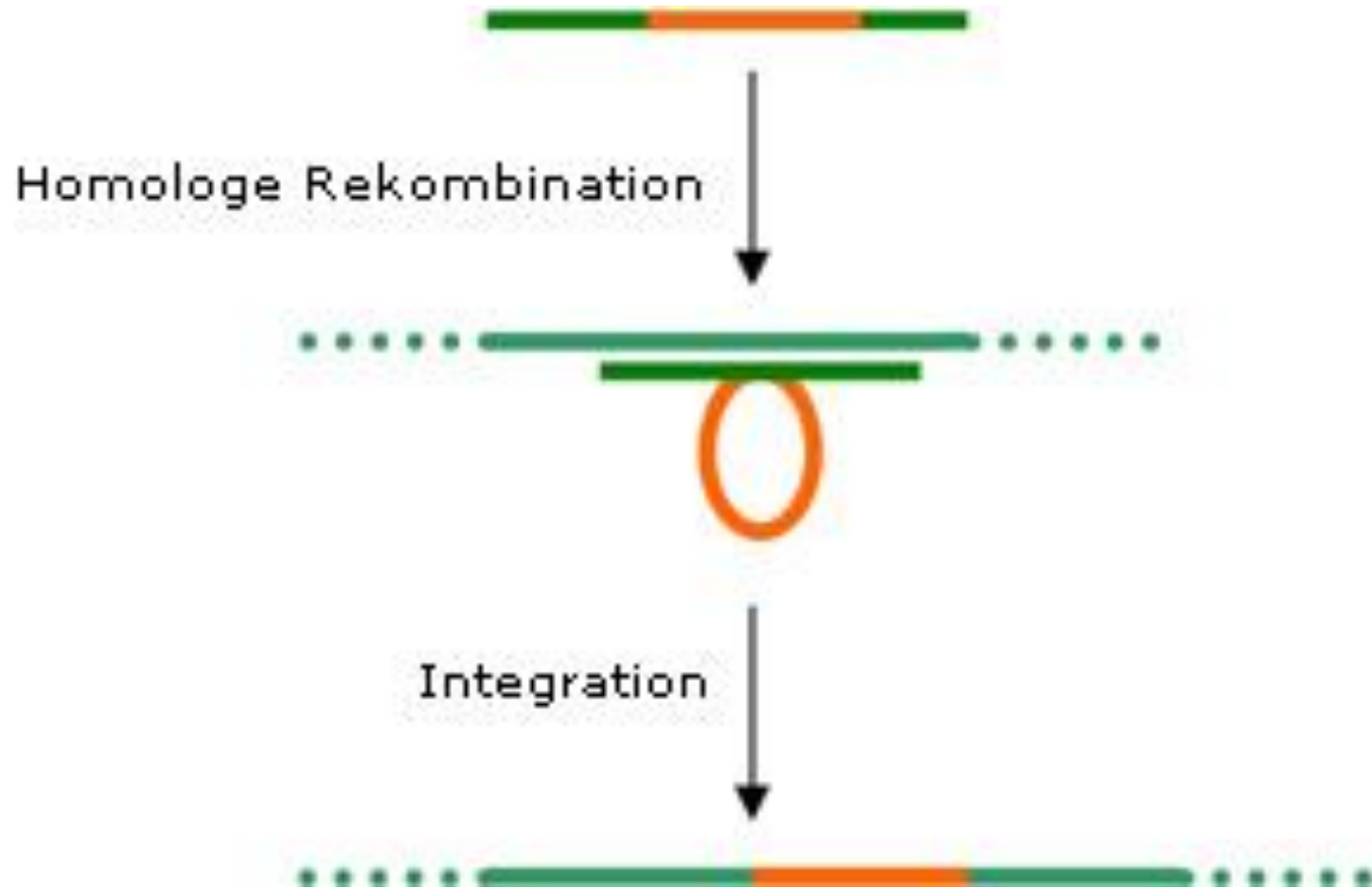


Интеграция Т-ДНК

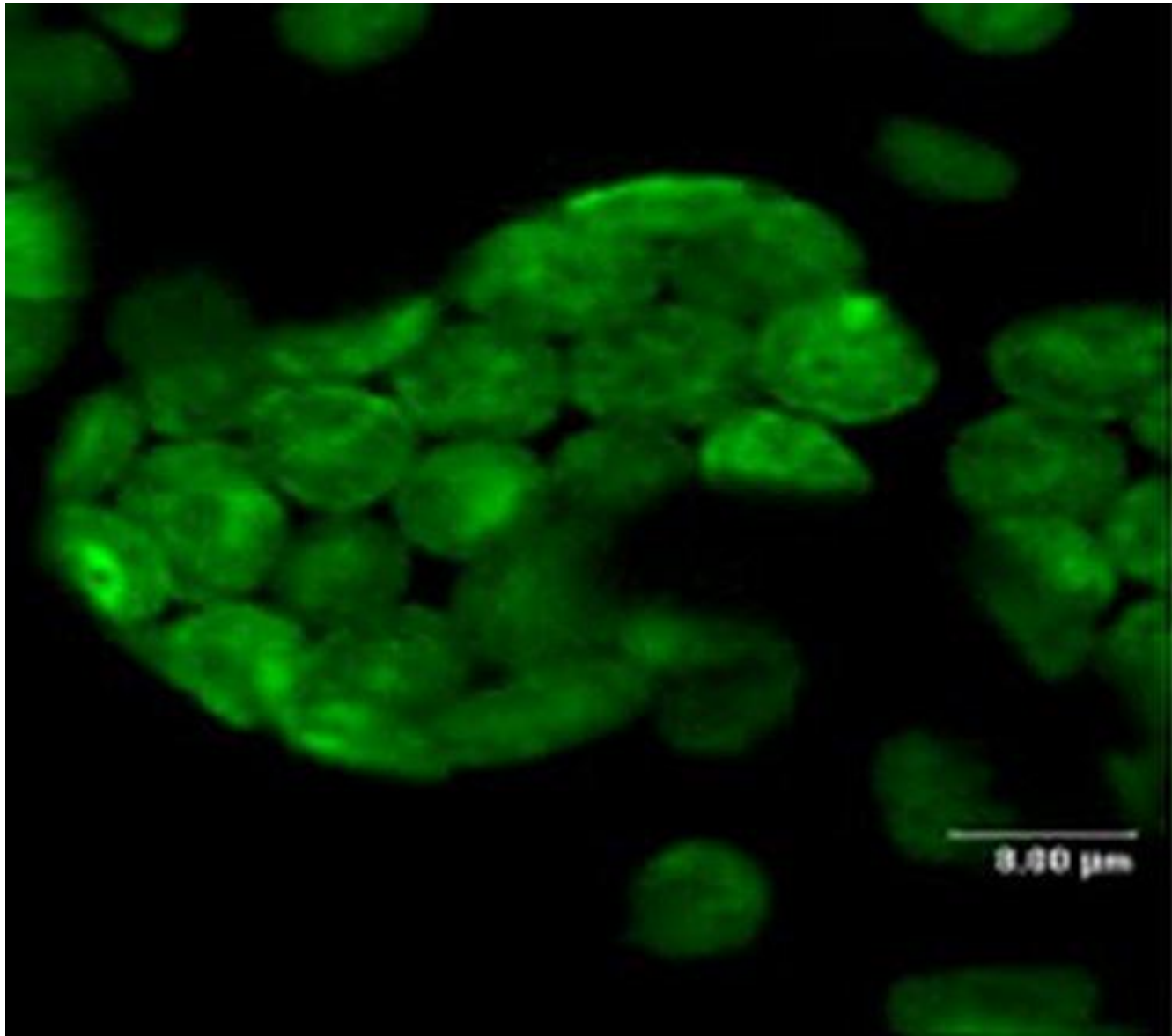




Пластидная трансформация

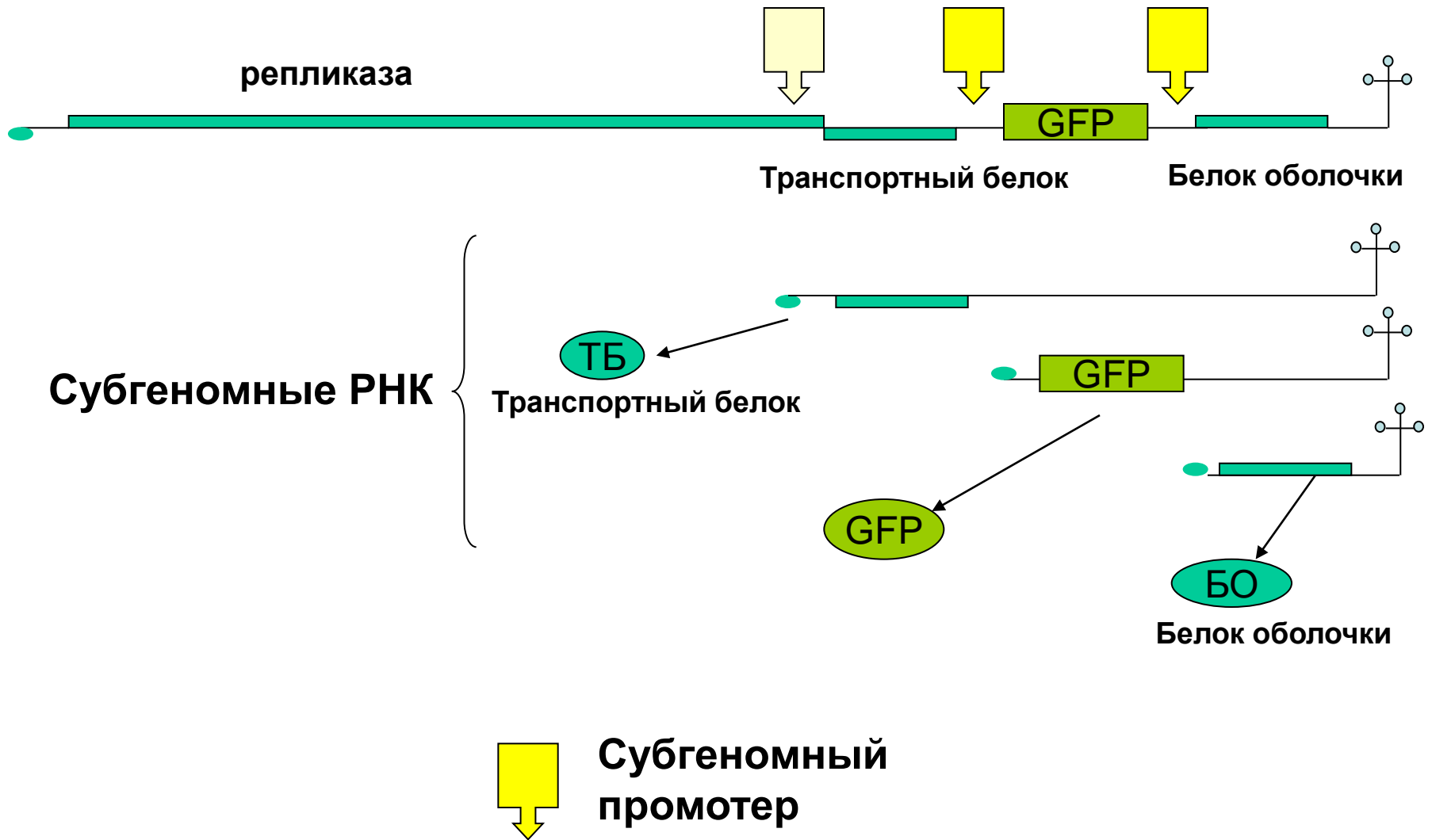


Пластидная трансформация

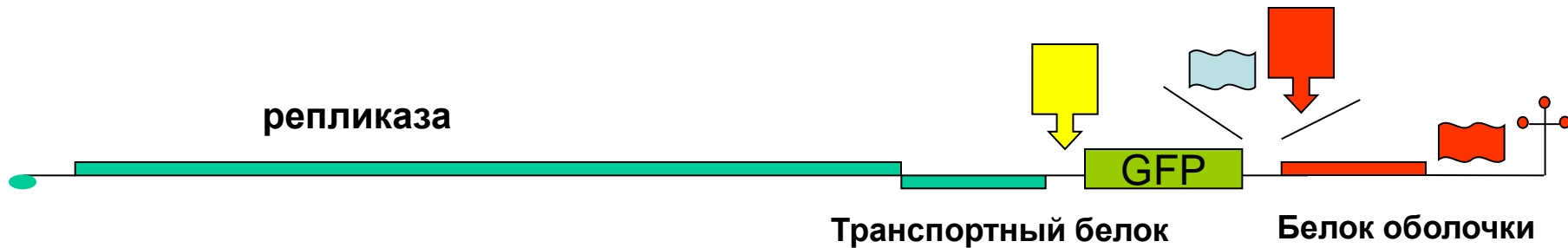
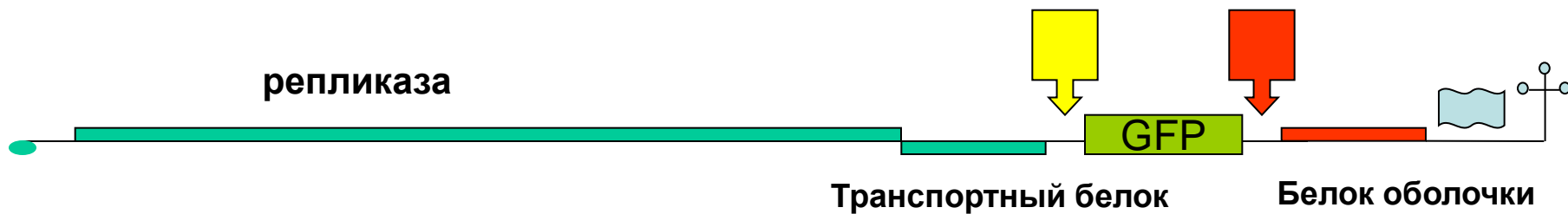
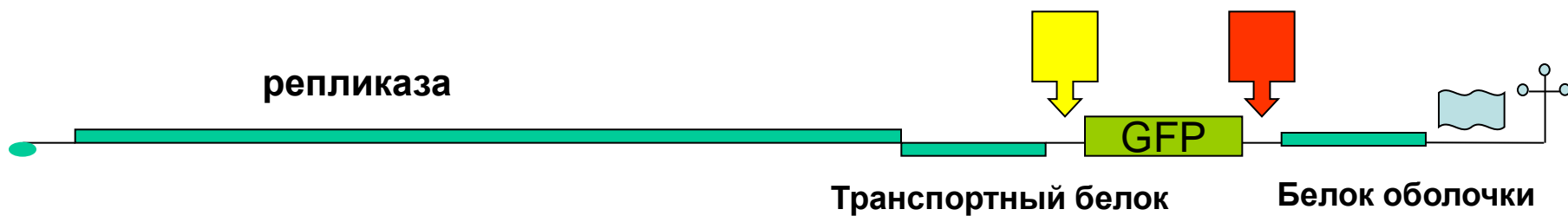
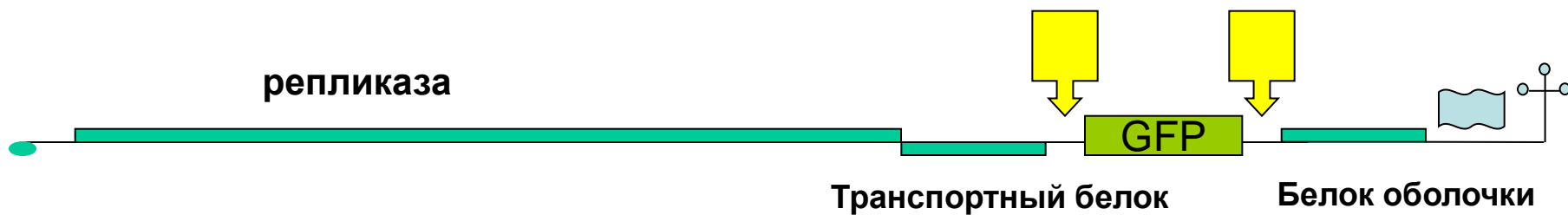


- **Временная экспрессия белка**
- Целевой ген либо геном вируса-вектора включается в бинарный вектор с последующей доставкой его в клетки заражаемого растения методом агроинфильтрации.
- Высокая продукция целевого белка (ЦБ) достигается за счет репликации рекомбинантных вирусом-векторов, содержащих ген ЦБ.

Вирусные векторы

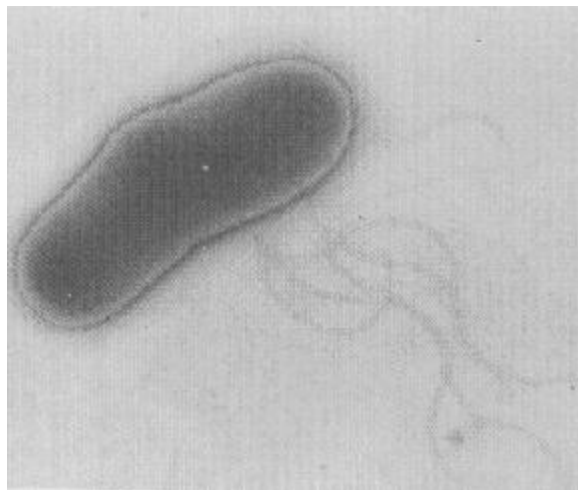
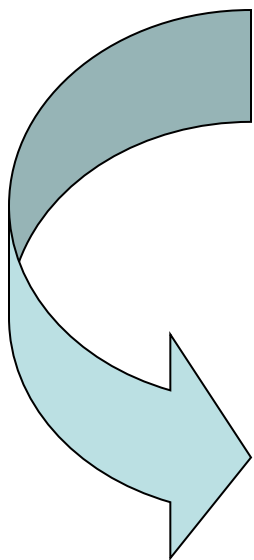
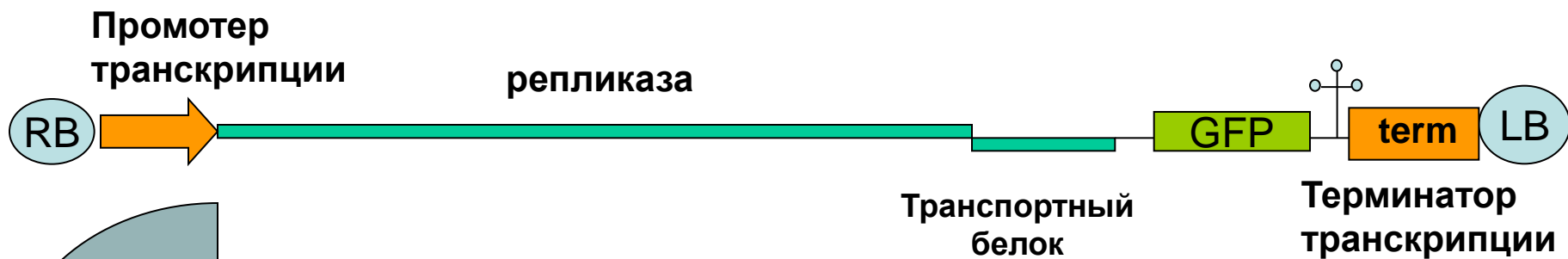


Вирусные векторы



 Область псевдоузлов

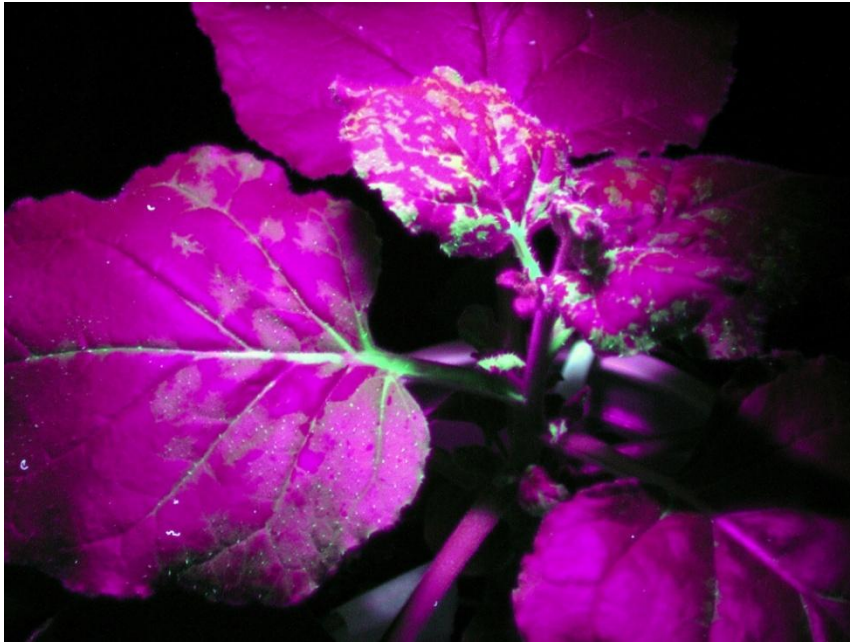
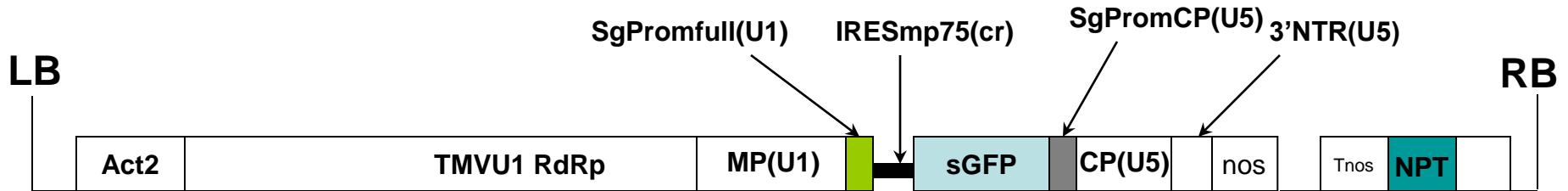
Вирусные векторы Агроинфильтрация



Agrobacterium tumefaciens

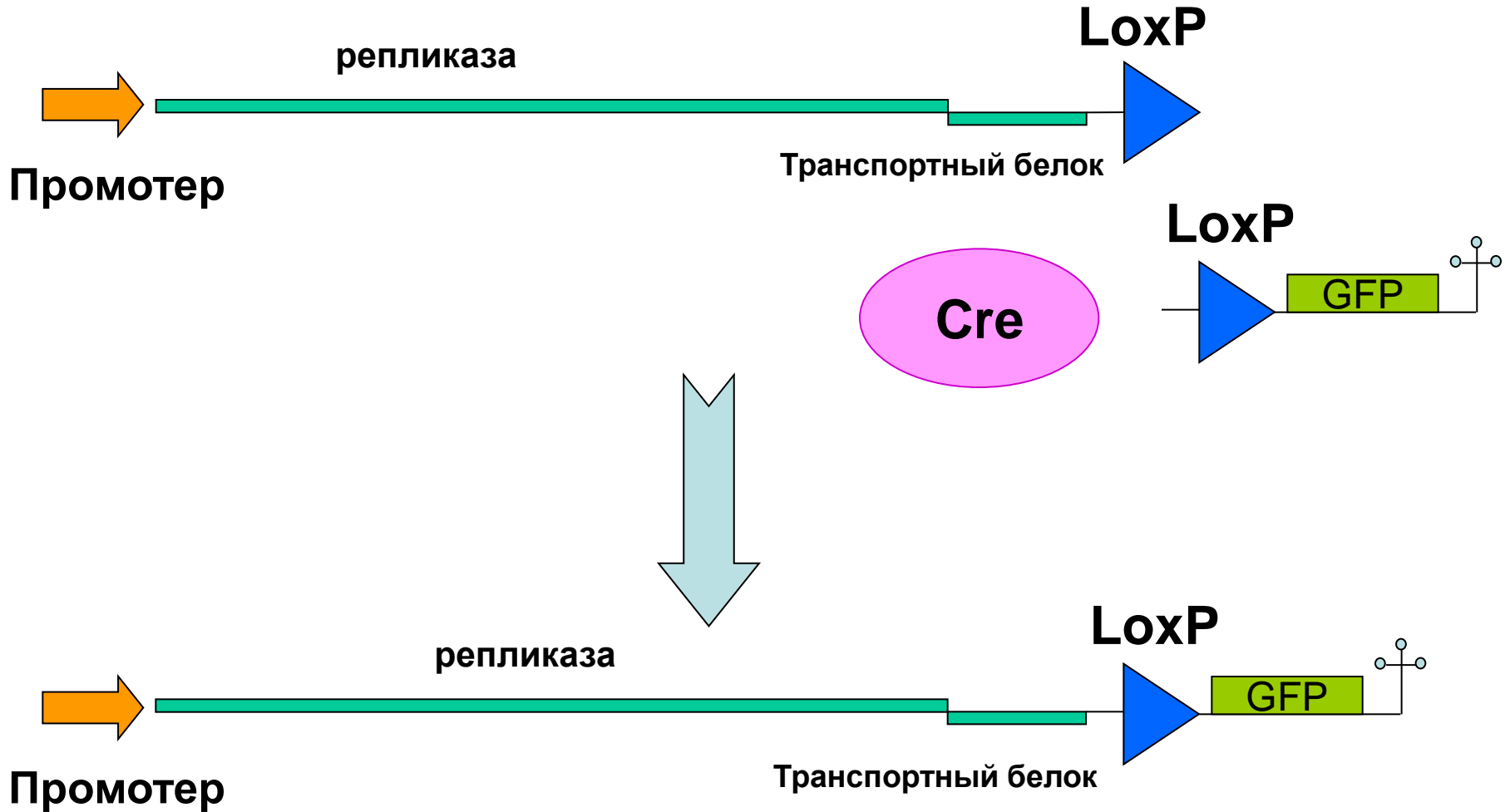


Вирусные векторы Агроинфильтрация

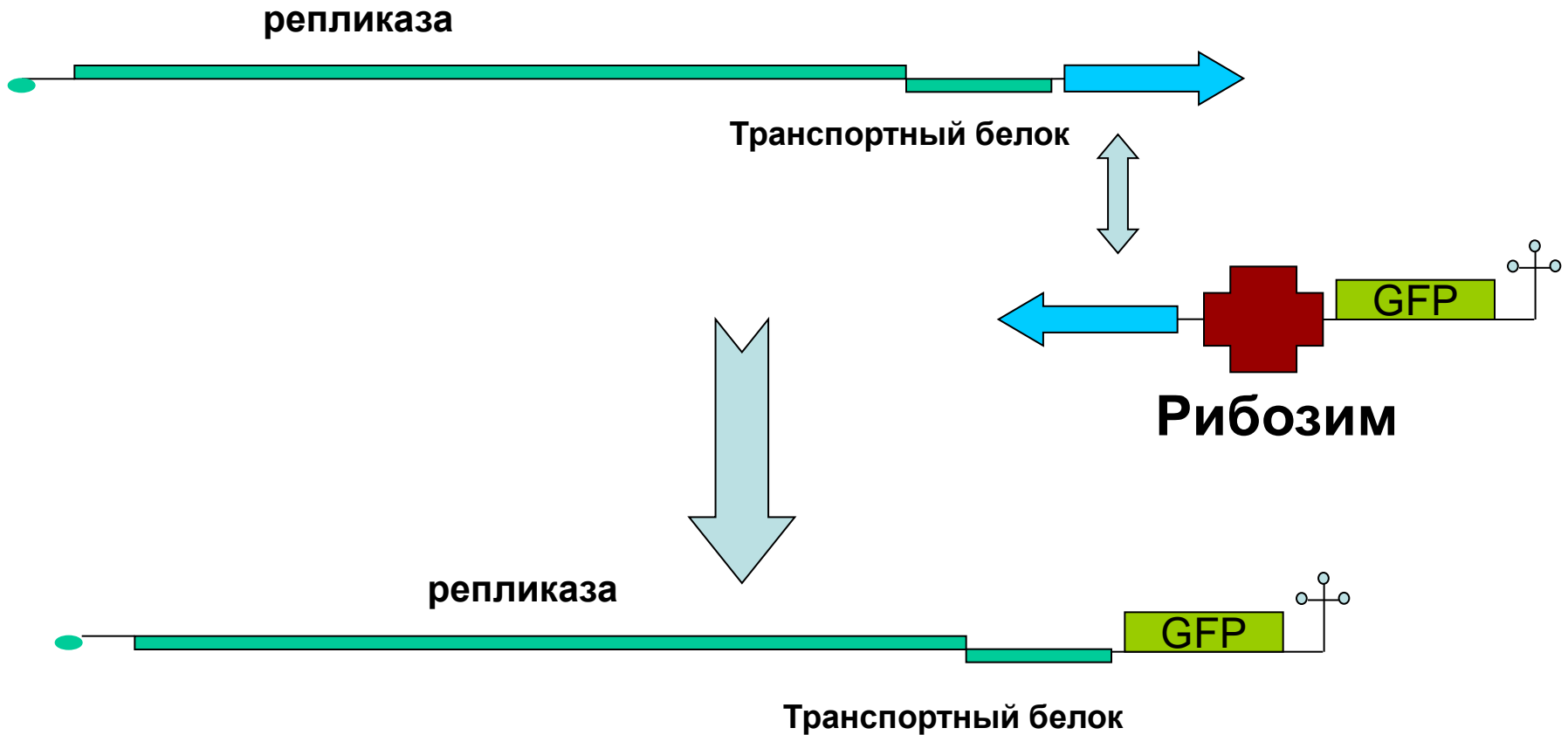


11 дней после инокуляции

Сборка вирусного вектора из фрагментов с помощью сайт-специфической рекомбинации (ДНК-уровень)

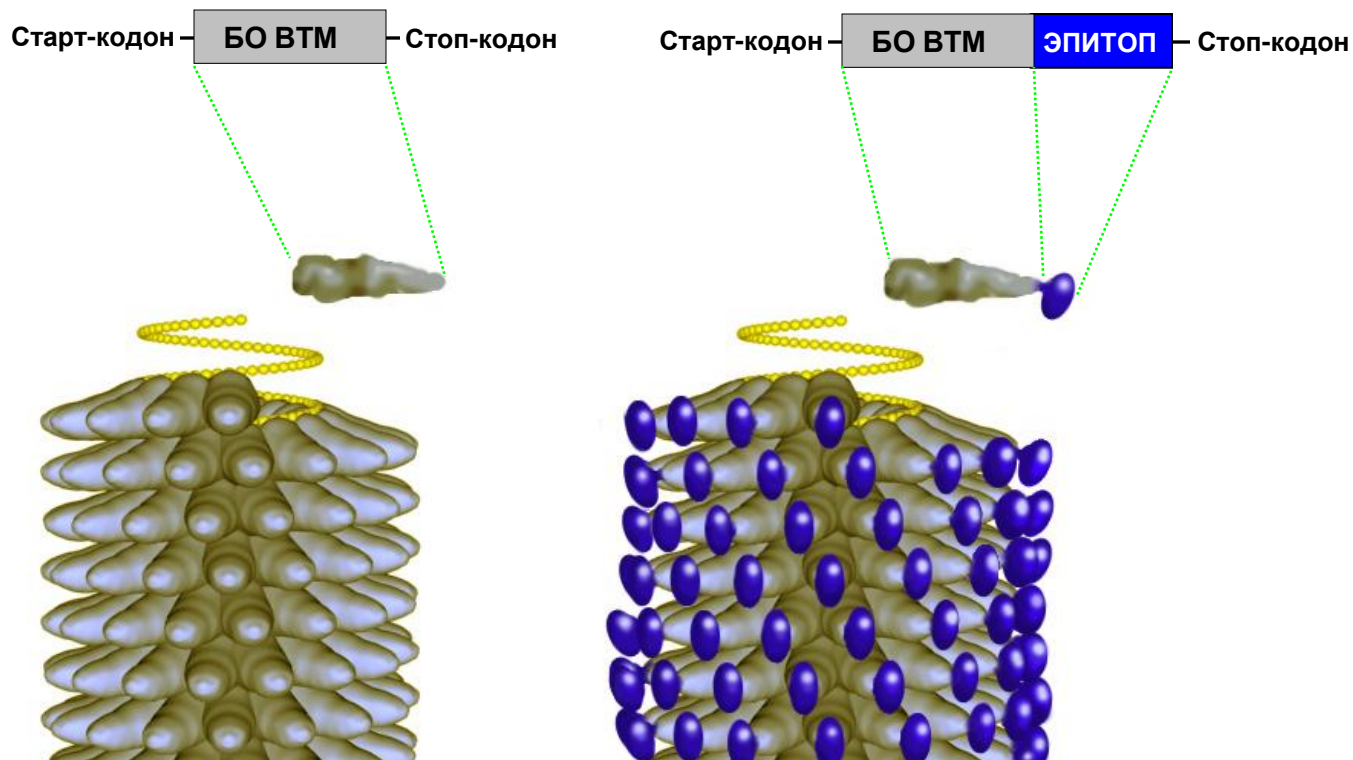


Сборка вирусного вектора из фрагментов с помощью транс-сплайсинга (РНК-уровень)



Любая последовательность длиной 200-400 нт

Синтез пептидов, экспонированных на поверхности вирусной частицы

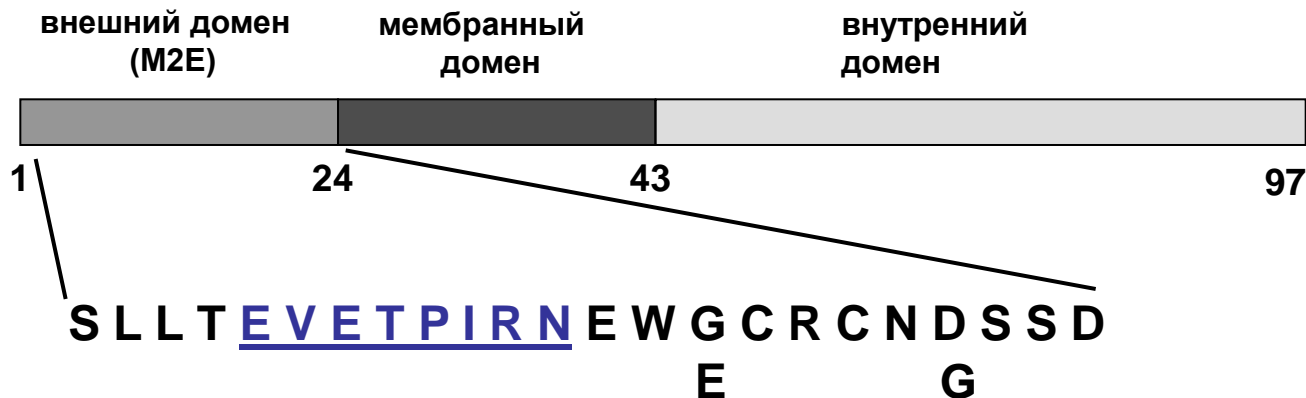
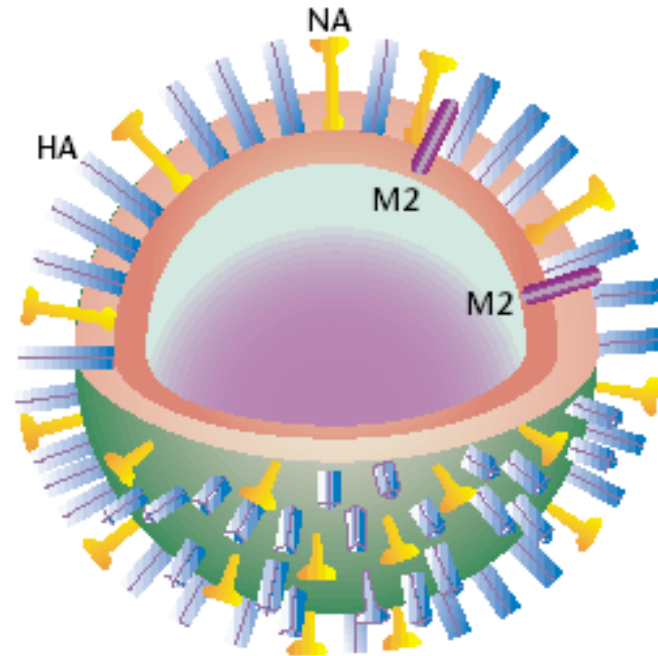


**НАТИВНЫЙ
ВТМ**

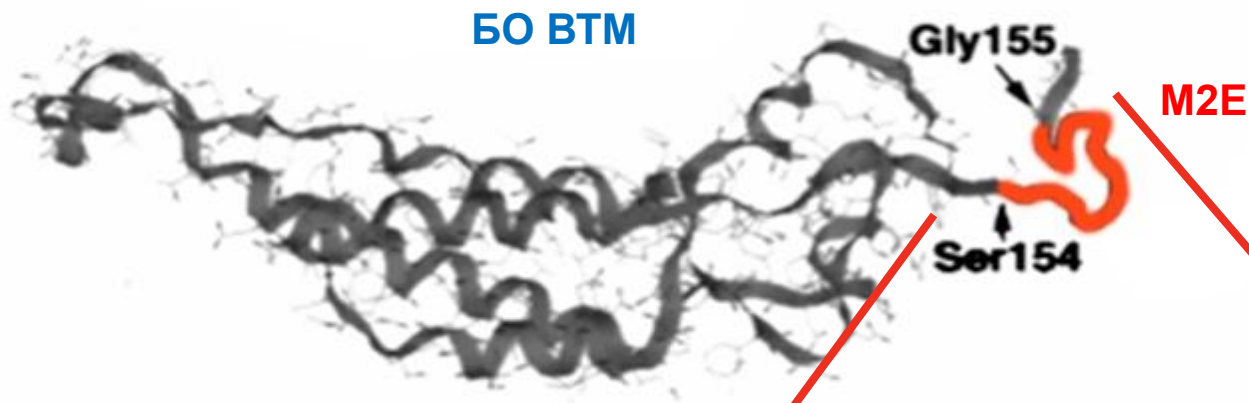
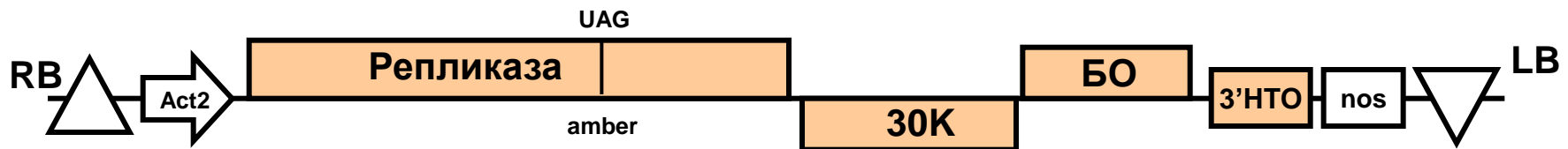
**ХИМЕРНЫЙ
ВИРУС**

М2 белок вируса гриппа

Один вирион гриппа А содержит 14-68 копий матричного белка М2, который состоит из 3-х участков. Исследование 55 изолятов, известных с 1933 года, позволило определить консервативную последовательность внешнего домена (М2Е). Укороченный пептид сохраняет иммуногенные свойства (подчеркнуто).



Вирус табачной мозаики с эпитопом вируса гриппа



BTM-M2E = SLLTEVETPIRNEWECRCNDSSD
BTM-M2E-ser = SLLTEVETPIRNEWESRSNDSSD

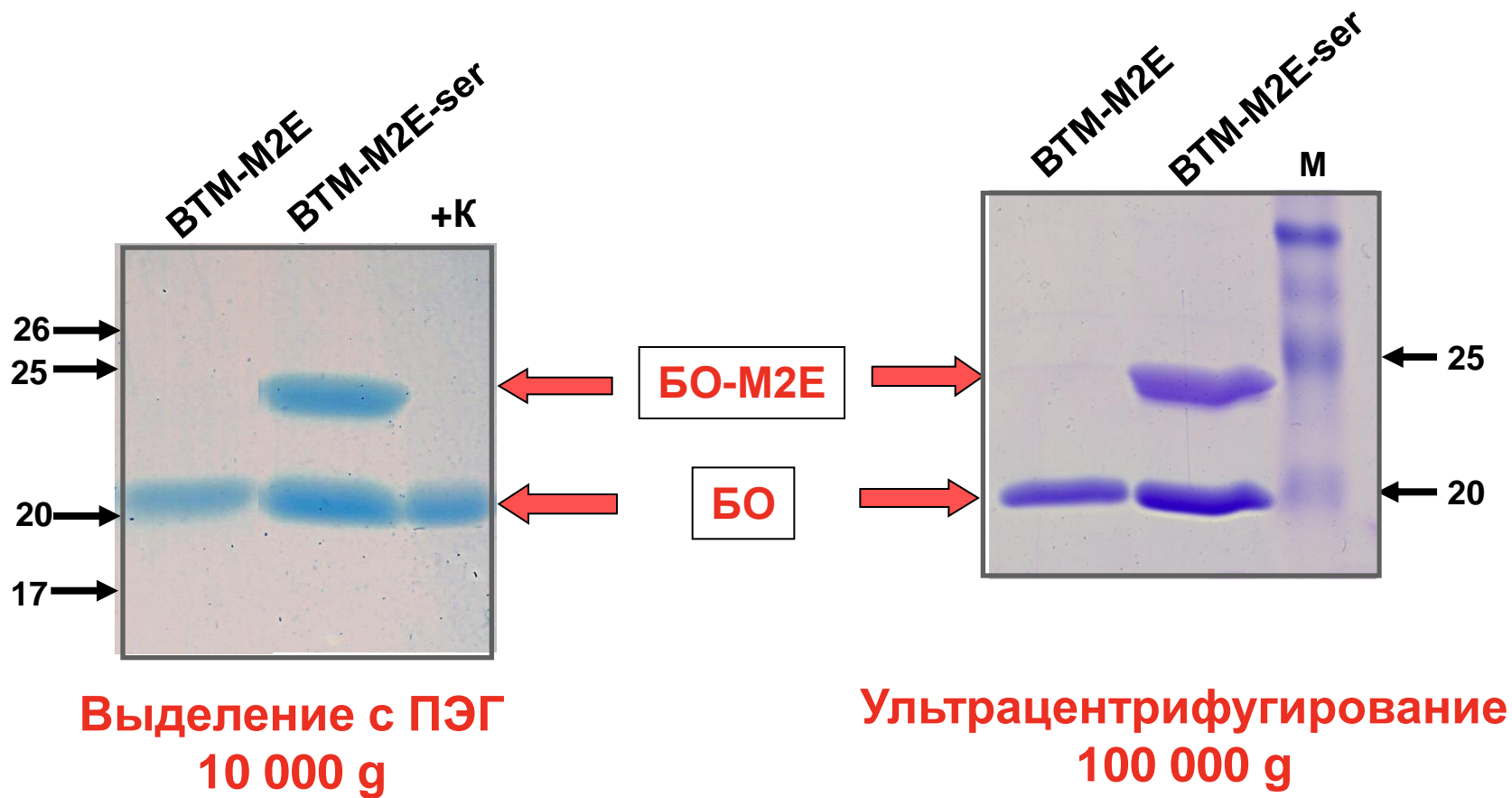
Системная инфекция вектора ВТМ-М2Е



9 дней после
инокуляции

*Nicotiana
benthamiana*

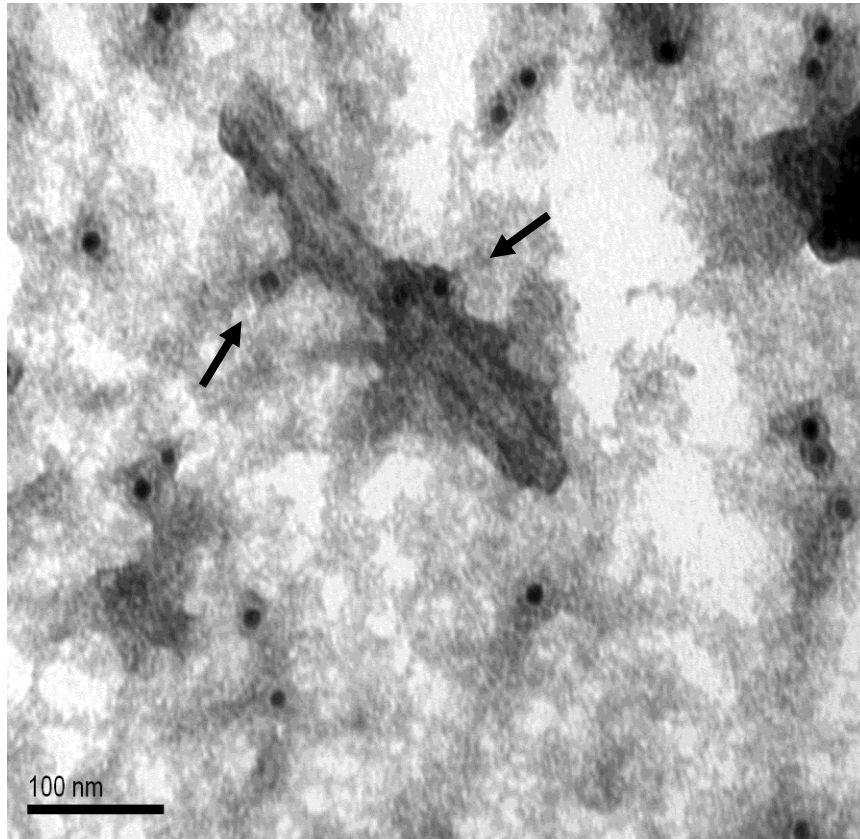
Выделение химерных вирионов из системных листьев



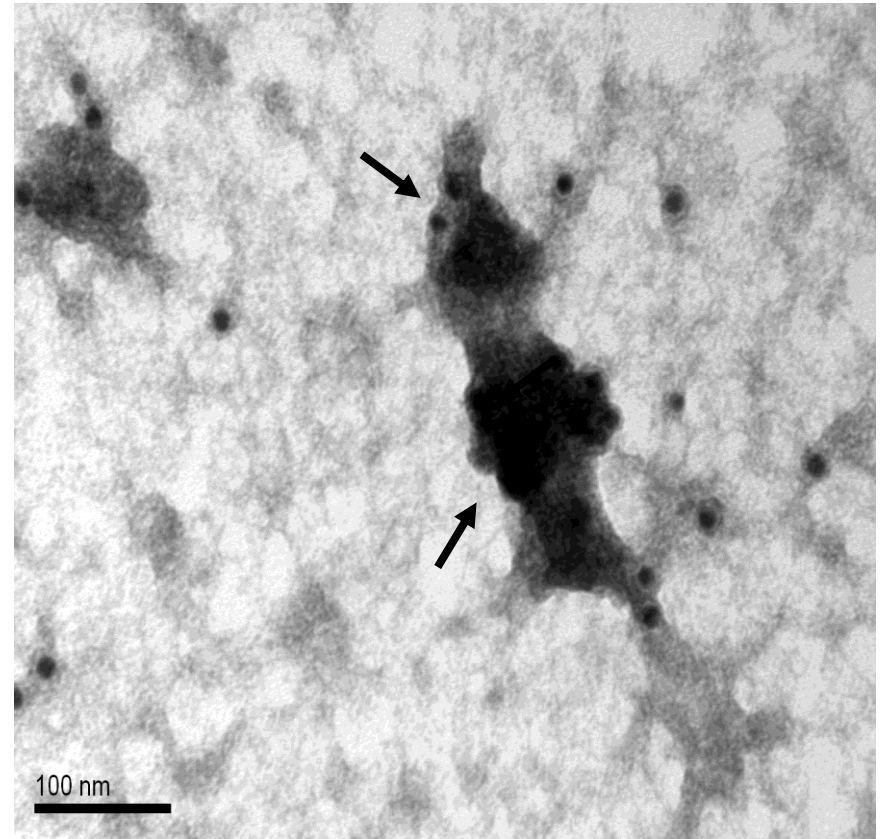
15% ПААГ, окрашивание по Кумасси

Иммуноэлектронная микроскопия с антителами, конъюгированными с частицами золота

BTM-M2E

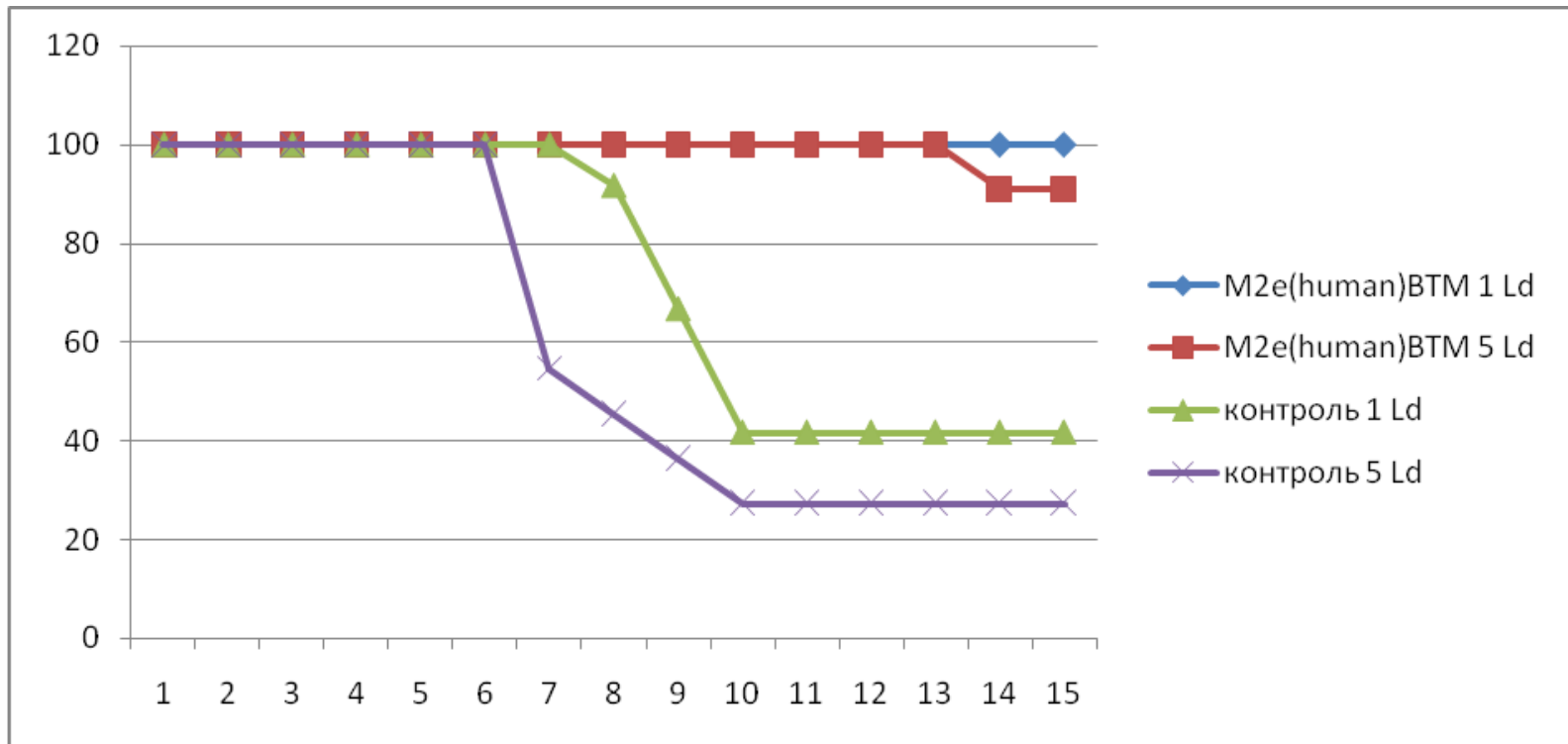


BTM-M2E-ser



50 mM боратный буфер pH 9.0; Увеличение - 300K

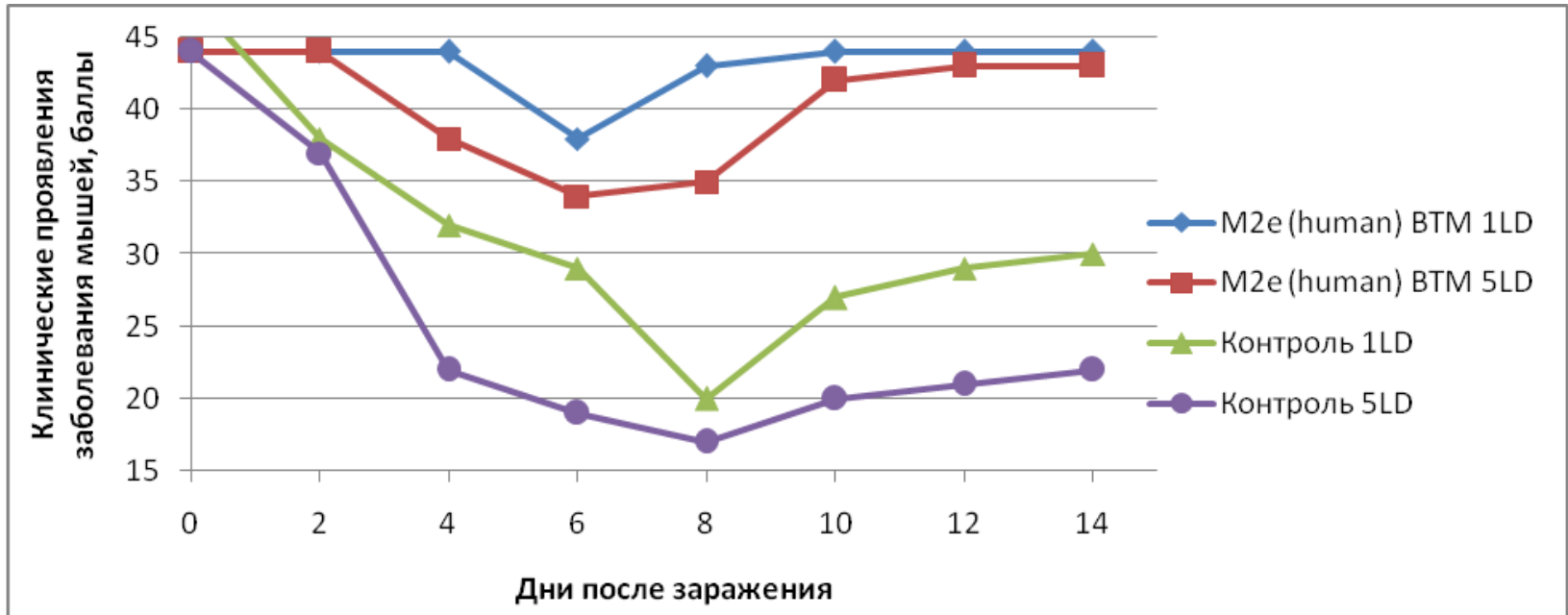
Защитное действие рекомбинантной вакцины ВТМ-М2е-ser: выживаемость мышей после инфекции



Мыши - Balb/c (18-20 г). Иммунизация – 3 раза, доза вакцины - 50 мкг, адьюванты - Sigma system (1), Фрейнда (2-3)

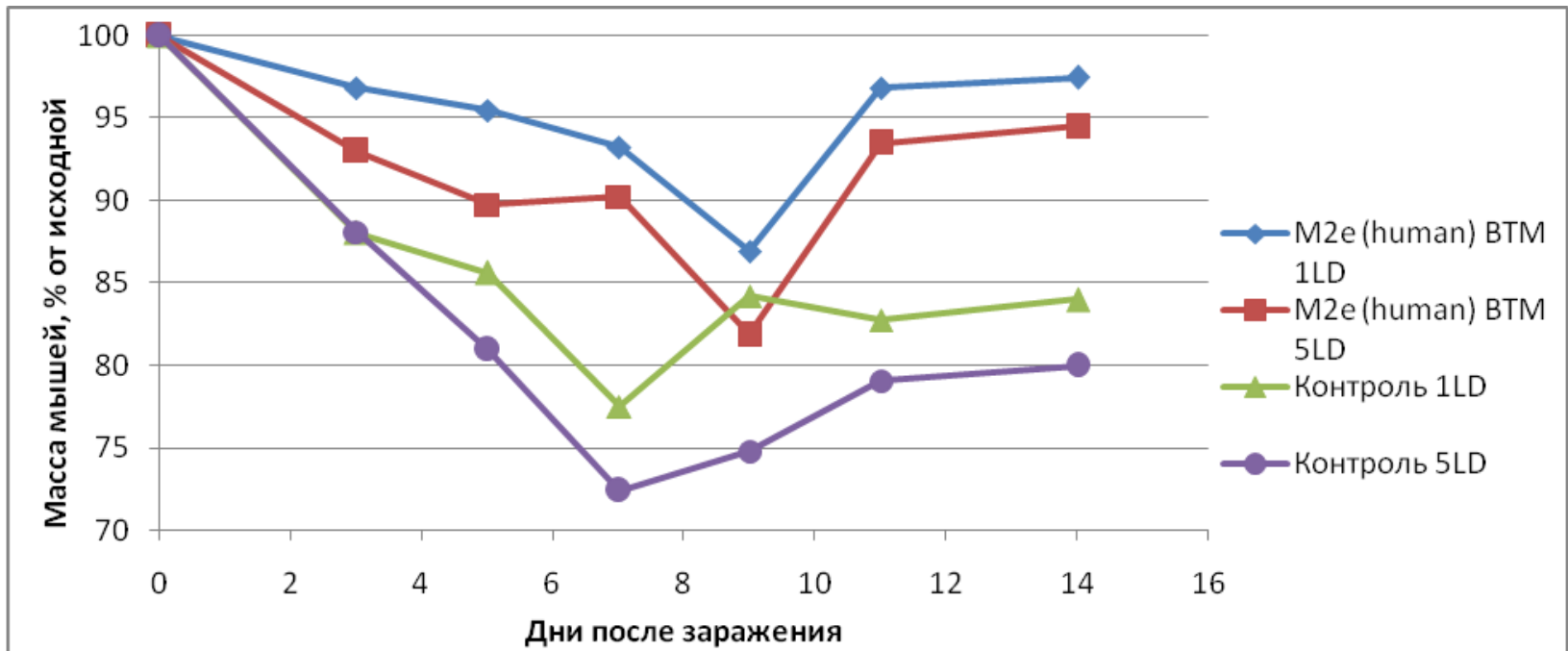
Вирус гриппа A/PR/8/34 (H1N1), 50 мкл/мышь

Защитное действие рекомбинантной вакцины ВТМ-М2е-ser: клинические проявления заболевания



Вирус гриппа A/PR/8/34 (H1N1), 50 мкл/мышь

Защитное действие рекомбинантной вакцины ВТМ-М2е-ser: динамика массы тела



Вирус гриппа A/PR/8/34 (H1N1), 50 мкл/мышь