

O. G. Gorshkova, T. V. Gudzenko, O. V. Voliuvach
I. I. Mechnikov Odessa National University, Odessa, Ukraine

BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES STRAIN *PSEUDOMONAS SEPACIA* ONU-327 - PHENOLIC AND DESTRUCTOR HARD OXIDIZING COMPOUNDS

It was established experimentally that isolated from contaminated soil biochemical activity of the non-pathogenic microorganism strain - identified as *Pseudomonas sepacia* ONU-327 is capable of transferring "salvo load" of heavy metal ions. The concentrations of individual heavy metal ions were determined, which are "threshold" for the strain under study: Ni (II) - 10 mg/l; Cu (II) - 50 mg/l; Zn (II) - 20 mg/l; Pb (II) - 60 mg/l. The sorption-accumulating capacity of strain *P. cepacia* ONU-327 is increased in the sequence: Ni (II) < Cu (II) < Zn (II) < Pb (II). Especially high resistance of *P. cepacia* strain ONU-327 was detected with respect to Pb (II). It was shown that when water was treated with a microbiological reagent - *P. cepacia* ONU-327 in the biofloculs, the concentration of Pb (II) in water decreased most from 60.0 to 0.03 ± 0.003 mg/l. The high efficiency of biotechnological treatment of industrial wastewater and sewage of medical enterprises with the main content of phenolic compounds was experimentally confirmed with the help of microbiological reagent - strain *P. cepacia* ONU-327. Complete dephenolization of water (in the presence of heavy metal ions) at a temperature of 30 ° C was carried out for 18-20 days. Advantages of the developed method of dephenolization of industrial waters using the strain *P. cepacia* ONU-327 is environmental safety, high efficiency, ease of implementation, does not cause secondary pollution, does not require any drastic changes in production technology. The discovered polyfunctional biotechnological properties of the nonpathogenic biochemical active strain *P. cepacia* ONU-327 make it possible to recommend it as a part of biologics intended for wide use in biotechnologies of wastewater treatment from highly toxic heavy metal ions and phenolic compounds.

Key words: Pseudomonas sepacia ONU-327, sorbent of heavy metals, phenolic compounds destructor

Рекомендує до друку
Н. М. Дробик

Надійшла 30.01.2017

УДК 5.57.576.4

¹А. О. ПОТРОХОВ, ³З. В. ЗУБР, ²О. П. ТРОХИМЕНКО, ¹Н. А. МАТВЄЄВА

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03680

²Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика
вул. Дорогожицька, 9, Київ, 04112

³Інститут вірусології Словацької Академії наук
вул. Дубравска, 9, Братислава, Словачія, 84505

**ОЦІНКА ПРОТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ
ЕКСТРАКТИВ ІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ТЮТЮНУ
З ГЕНОМ ІНТЕРФЕРОНУ α -2b ЛЮДИНИ**

Здійснено оцінку активності екстрактів із трансгенних рослин тютюну з геном інтерферону α -2b людини. Вміст інтерферону становив від 1017 до 2295 пг/г маси загального розчинного білка. При тестування екстрактів, отриманих з трансгенних рослин, на культурі клітин перещеплювальних текстикул поросят (ПТП), яка була інфіковані вірусом везикулярного стоматиту (ВВС), виявили інтерфероподібну активність від $1,553 \times 10^{-3}$ до $3,009 \times 10^{-3}$ МО/мг. Поряд із цим, рослини не набули стійкості до фітовірусних інфекцій. Інфікування трансгенних рослин різними фітовірусами призводило до розвитку захворювань.

Ключові слова: інтерферон, трансгенні рослини, фітовіруси

Трансгенні рослини з геном інтерферону вперше були створені на початку 90-тих років 20 сторіччя [2]. Зважаючи на противірусну активність інтерферону, дослідниками було висунуто припущення про його наявність у рослинних організмах. Також встановлено, що інтерферон може синтезуватися у клітинах рослин, до яких був перенесений відповідний ген, і синтезований у рослинних системах продукт є біологічно активним [1, 3, 6].

Оскільки встановлено, що інтерферон може синтезуватися та бути активним у рослинних клітинах, було висунуто гіпотезу, згідно з якою він може бути використаний для захисту рослин від фітовірусів. Так, в 90-тих роках 20 сторіччя було показано, що перенесення гена інтерферону людини в геном рослин може приводити до підвищення стійкості рослин до фітовірусної інфекції [4, 9, 10]. Однак, у цих дослідженнях не було визначено, чи синтезувався інтерферон у клітинах рослин та чи виявляв він антивірусну активність на культурах клітин.

Метою нашої роботи було оцінити противірусну активність трансгенних рослин тютюну с геном *ifn-a2b* та встановити можливу участь інтерферону в захисті рослин від фітовірусних інфекцій.

Матеріал та методи досліджень

Для генетичної трансформації рослин тютюну *Nicotiana tabacum* L. сорту *Petit Havana* використовували бактерії *Agrobacterium tumefaciens* штам GV3101 з вектором PCV 124 з цільовим геном *ifn-a2b* людини під 35S промотором і селективним геном *nptII*. Експланти кокультивували з бактеріальною суспензією 30 хв, після кокультивації їх переносили на агаризоване середовище MC [5] з додаванням 2,5 мг/дм³ ВАР; 0,05 мг/дм³ NAA, 500 мг/дм³ цефотаксиму і 25 мг/дм³ канаміцину для регенерації рослин у селективних умовах. Отримані на селективному середовищі зелені рослини культивували на середовищі 1/2 MC (MC, в якому вміст макросолей зменшено вдвічі) з додаванням 25 мг/дм³ канаміцину і 500 мг /дм³ цефотаксиму.

Для отримання екстрактів листки дослідних рослин висушували та зважували. Сухий матеріал розтирали на льоду з аліквотою фосфатного буферу (рН 7,4) та центрифугували 15 хв, 15 тис. g при +4 С⁰. Супернатант відбирали та додавали фосфатний буфер (рН 7,4) з 1% додецил сульфатом натрію та 1мМ PMSF, центрифугували при + 4 С⁰ 15хв 15 тис. g. Потім супернатанти змішували.

Визначення противірусної активності досліджуваних екстрактів рослин проводили за пригніченням цитопатичної дії тест-вірусу у субстратзалежній культурі клітин перещеплювальних текстикул поросят (ПТП) з колекції вірусологічної лабораторії ДУ "Інституту отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України". Як тест-вірус використовували вірус везикулярного стоматиту (ВВС) штам Indiana з інфекційним титром 4,0 ІgТЦД50/0,1 мл з музею кафедри вірусології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України, попередньо адаптований до культури клітин ПТП. Як референтний препарат використовували рекомбінантний інтерферон *ifn-a2b* людини з противірусною активністю 100000 МО/мл виробництва НПО "Біофарма" Україна. Дослідження проводили мікрометодом у 96-лункових культуральних планшетах Sarstedt (Німеччина)

Визначення наявності інтерферону проводили за стандартною методикою з використанням набору регентів ProCon100 виробництва фірми "Протеїновий контур" (Росія).

Вірус мозаїки люцерни (AMV), вірус тютюнової мозаїки (TMV), вірус картоплі Y (PVY), вірус картоплі X (PVX) і вірус картоплі A (PVA) механічно інокулювали в рослини тютюну. Через два тижні після зараження проводили імунофепментний аналіз ІФА аналіз на наявність вірусів (Gallo і Matisová, 1993). Первинні антитіла (були надані доктором Черовска, Прага) розводили 1:1000, кон'юговані лужною фосфатазою, вторинні (анти-кролячий IgG) антитіла (Sigma) розводили 1: 10000. Імуноблотинг рослин проводили з використанням тих же антитіл і розведень [7].

Результати досліджень та їх обговорення

Раніше методом агробактеріальної трансформації були отримані рослини тютюну, стійкі до антибіотика канаміцину. Трансгенна природа цих рослин була раніше підтверджена методом

полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів, специфічних до генів *ifn-α2b* та *nptII*. Методом ЗТ-ПЛР було визначено активність гена інтерферону. Було показано наявність активного гена *ifn-α2b* людини.

Методом ІФА визначили наявність інтерферону в рослинних екстрактах. Встановлено, що вміст цільового білка в трансгенних рослинах коливався в межах від 1017,151 до 2295,392 пг/г маси.

Для визначення противірусної активності отриманого інтерферона проводили відповідний аналіз інтерферону з використанням субстратзалежної культури клітин ПТП, інфікованих ВВС. Нами встановлено, що отримані екстракти виявляли інтерфероподібну активність у межах 3,274–6312 МО/г маси або $1,553 \times 10^{-3}$ – $3,009 \times 10^{-3}$ МО/мг (табл. 1).

Як видно з табл. 1, екстракти контрольних нетрансформованих рослин інтерфероподібної активності не проявляли.

Таблиця 1

Вміст інтерферону *ifn-α2b* людини в рослинних екстрактах та його активність на культурі клітин ПТП, інфікованих ВВС.

| Рослини | Вектор | Вміст інтерферону пг/г маси | Активність інтерферону МО/мг | Активність інтерферону МО/г маси |
|-----------------------------------|---------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| <i>Nicotiana tabacum</i> | pCB 124 | 1123,328 | $1,553 \times 10^{-3}$ | 3274 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | pCB 124 | 1017,151 | $3,009 \times 10^{-3}$ | 6312 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | pCB 124 | 2295,392 | $1,614 \times 10^{-3}$ | 5000 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> контроль | - | 0 | 0 | 0 |

Таким чином, екстракти з трансгенних рослин тютюну з геном *ifn-α2b* людини, отриманих методом агробактеріальної трансформації, виявляли інтерфероподібну противірусну активність на клітинах ПТП, інфікованих ВВС.

Оскільки встановлено, що інтерферон може синтезуватися та бути активним у рослинних клітинах, доцільною була перевірка гіпотези, згідно з якою інтерферон у рослинах може бути використаний для їх захисту від фітовірусів [4]. Для цього після визначення вмісту інтерферону, дослідні рослини інфікували вірусом мозаїки люцерни (AMV), вірусом тютюнової мозаїки (TMV), вірусом картоплі Y (PVY), вірусом картоплі X (PVX) та вірусом картоплі A (PVA). Усі дослідні рослини інфікувалися, затримки розвитку інфекції не спостерігали. Візуально спостерігали типові симптоми вірусних захворювання: плямистість, хлоротичність та деформацію листків (рис. 1).



Рис. 1. Симптоми ураження ВТМ та PVX

Наявність вірусу встановлено за допомогою методів ІФА та імуноблотингу (рис. 2).

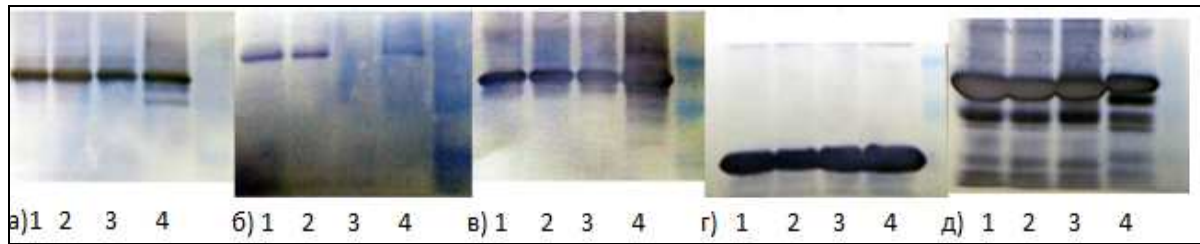


Рис. 2. Імуноблотинг інфікованих рослин тютюну з геном інтерферону.

Примітки: а) вірус картоплі А; б) вірус картоплі Y; в) вірус картоплі X; г) вірус тютюнової мозаїки; д) вірус мозаїки люцерни; 1, 2, 3 – лінії трансгенних рослин, 4 – контрольні нетрансформовані рослини.

Отже, незважаючи на виявлену противірусну інтерфероподібну активність екстрактів трансгенних рослин до ВВС, усі дослідні рослини не набули здатності протидіяти рослинним фітовірусам.

У результаті отримано трансформовані рослини тютюну, в яких виявлено цільовий білок і доведено його біологічну активність проти ВВС на клітинах ПТП. Однак, після інфікування рослин фітовірусами показано, що інтерферон не викликав затримку розвитку інфекції. Неспроможність інтерферону захищати рослини від фітовірусної інфекції можна пояснити відсутністю необхідних компонентів 2–5А системи інтерферону в рослинах. Наші результати узгоджуються з літературними даними про те, що в рослинних системах розвиток вірусної інфекції не залежить від наявності біологічно активного інтерферону, оскільки в рослинах відсутні необхідні компоненти для ефективної роботи системи їх захисту інтерфероном [8, 9],

Висновки

Нами встановлена наявність інтерферону в трансгенних рослинах тютюну з геном *ifn-a2b* та *nptII* за допомогою методу ІФА. Кількість інтерферону в рослинах становила від 1017 до 2295 пг/г маси. Екстракти трансгенних рослин характеризувалися інтерфероподібною активністю стосовно культури клітин ПТП, інфікованих ВВС, яка знаходилась у межах від $1,553 \times 10^{-3}$ до $3,009 \times 10^{-3}$ МО/мг маси. Однак, після інукулювання фітовірусами рослин було візуально підтверджено розвиток у них симптомів вірусного ураження. Методом ІФА та імуноблотингу відмічена наявність цільових вірусних продуктів у піддослідних рослин. Таким чином, хоча рослини і мали в своєму складі активний ген інтерферону, а їх екстракти характеризувалися противірусною активністю на культурі клітин ПТП, однак вони не могли зупинити розвиток фітовірусної інфекції в своєму організмі. Наші результати підтверджують недоцільність використання гена інтерферону як захисного механізму проти фітовірусів.

Робота виконана в рамках спільного наукового україно-словацького проекту 2014–2016рр. “Вивчення впливу генетичної трансформації з використанням векторів з геном інтерферону альфа 2в людини на стійкість трансгенних рослин до фітовірусів”.

1. Chen T. L. Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures / [T.L. Chen, Y.L. Lin et al.] // Transgenic Res. — 2004. — Vol. 13. — P. 499–510.
2. Edelbaum O. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants / [O. Edelbaum, D. Stein et al.] // J. Interferon. Res. — 1992. — Vol. 12. — P. 449–453.
3. Masumura T. Production of biologically active human interferon-a in transgenic rice / [T. Masumura, S. Morita et al.] // Plant Biotechnology — 2006. — Vol. 23. — P. 91–97.
4. Mitra A. A mammalian 2,5A system functions as an antiviral pathway in transgenic plants / [A. Mitra, D. Higgins et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1996. — Vol. 93. — P. 6780–6785.
5. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. — 1962. — Vol. 15. — P. 473–497.
6. Ohya K. Expression of two subtypes of human IFN-alpha in transgenic potato plants / [K. Ohya, T. Matsumura et al.] // J. Interferon. Cytokine Res. — 2001. — Vol. 21. — P. 595–602.
7. Novakov S, Subr J. Expression of a part of the potato virus A non-structural protein P3 in *Escherichia coli* for the purpose of antibody preparation and P3 immunodetection in plant material / S. Novakov, J.E. Klaudiny, Z.W. Kollerov // Journal of Virological Methods. — 2006. — Vol. 137 (2). — P. 229–235.

8. *Pyung Ok Lim* Multiple virus resistance in transgenic plants conferred by the human dsRNA-dependent protein kinase / Pyung Ok Lim, Ung Lee // *Molecular Breedin.* — 2002. — Vol. 10. — P. 11—18.
9. *Robert H.* Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response / H. Robert // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81. — P. 12720—12729.
10. *Rivkina M.* Analysis of virus resistance of tobacco and alfalfa transgenic plants bearing human β -Interferon / M. Rivkina, E. Deinekova, M. Komarova, A. Kochetova // *Gene Biotechnology & Biotechnological Equipment.* — 1995. — Vol. 9. — P. 40—44.

A. A. Потрохов, З. В. Зубр, А. П. Трохименко, Н. А. Матвеева

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Национальная медицинская академия последиplomного образования имени П. Л. Шупика
Институт вирусологии Словацкой Академии наук

ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ С ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С ГЕНОМ ИНТЕРФЕРОНА α -2B ЧЕЛОВЕКА

Осуществлена оценка активности экстрактов из трансгенных растений табака с геном интерферона α -2b человека. Содержание интерферона составляло от 1017 до 2295 пг / г массы общего растворимого белка. При тестировании экстрактов, полученных из трансгенных растений, на культуре клеток перевивных текстикул поросят (ПТП), которые были инфицированы вирусом везикулярного стоматита (ВВС), обнаружили интерфероноподобную активность от $1,553 \times 10^{-3}$ до $3,009 \times 10^{-3}$ МЕ / мг. Вместе с тем, растения не приобрели устойчивость к фитовирусным инфекциям. Инфицирование трансгенных растений различными фитовирусами приводило к развитию заболеваний.

Ключевые слова: интерферон, трансгенные растения, фитовирус

A. Potrokhov, A. Trokhymenko, Z. Zubr, N. Matveeva

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
Nationalna Medical Academy of Postgraduate Education named after Shupyk, Ukraine
Instytut Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

ASSESSMENT OF ANTIVIRAL ACTIVITY EXTRACT FROM TRANSGENIC TOBACCO PLANTS WITH HUMAN INTERFERON α -2B GENE

The presence of interferon in transgenic tobacco plants with human ifn- α 2b gene and nptII was established using ELISA method. For the genetic transformation were used *Nicotiana tabacum* L.cv Petit Havana, grown with the *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 PCV 124 vector with human gene ifn- α 2b under the 35S promoter and the selective nptII gene. Tobacco explants were co-cultivated with a bacterial suspension on the MS medium with edition 2,5 mg / dm³ BAR; 0,05 mg / dm³ NAA, 500 mg / dm³ cefotaxime and 25 mg / dm³ kanamycin (selective medium) for plants regeneration. Received green shoots were cultivated on the medium half MS (MS where content of macrosols was changed in twice) with 25 mg / dm³ kanamitsin 500 mg / dm³ cefotaxime. Extracts obtained from dry material. The dry material was roasted with an aliquot of phosphate buffer (pH 7.4), which was centrifuged 15 min 15000 G for + 4C⁰. The supernatant was sampled to give a phosphate buffer (pH 7.4) in 1% dodecyl sulfate sodium and 1 mM PMSF, centrifuged at + 4C⁰ 15min 15000 G. Determination of the antiviral activity of plant extracts was performed by inhibition of cytopathic action test virus in cell culture. As a test virus strain used VSV strain Indiana with infectious titer IgTTsD50 4.0 / 0.1 ml obtained from the Department of Virology museum Ministry of Health of Ukraine. As reference product used recombinant interferon ifn- α 2b with antiviral activity of 100,000 IU / ml production NPO "Biopharma" Ukraine. The study was conducted micromethod in 96-well culture plates Sarstedt (Germany)

Determination of interferon performed by the standard method using a set of reagents ProCon100 produced by "Protein contour" (Russia).

Alfalfa mosaic virus (AMV), tobacco mosaic virus (TMV), Potato virus Y (PVY), Potato virus X (PVX) and Potato virus A (PVA) mechanically inoculated into tobacco plants. After two weeks infection ELISA analysis was carried out for viruses (Gallo and Matisová, 1993). Primary antibodies (supplied by Dr. Cherovska, Prague) diluted 1: 1000 conjugated secondary alkaline phosphatase (anti-

rabbit IgG) antibody (Sigma) diluted 1: 10,000 Immunoblotting analyses were carried out using the same antibodies and dilutions.

Number of interferon in plants was in range of 1017 to 2295 pg / g of total soluble protein. Interferon like activity of extracts from transgenic plants was showed in pigs cell culture, infected by vesicular stomatitis virus, and it was in range of $1,553 \times 10^{-3}$ to $3,009 \times 10^{-3}$ IU / mg weight. However, after plants infection by fitoviruses, it was visually confirmed the symptoms develop of viral infection. Using ELISA and immunoblot method, it has been noted the presence of target viral products in test plants. Despite, that all transgenic plants had an active interferon gene and their extracts have been showed an antiviral activity in cell culture, this plants were not resistant for plant virus interferon and also they could not stopped the infection development.

Key words: interferon, transgenic plants fitovirus

Рекомендує до друку
Н. М. Дробик

Надійшла 30.01.2017