

ISSN 2518-1483 (Online),
ISSN 2224-5227 (Print)

2020 • 5

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

БАЯНДАМАЛАРЫ

ДОКЛАДЫ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

REPORTS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

PUBLISHED SINCE 1944



ALMATY, NAS RK

Бас редакторы
х.ғ.д., проф., ҚР ҰҒА академигі
М.Ж. Жұрынов

Редакция алқасы:

Адекенов С.М. проф., академик (Қазақстан) (бас ред. орынбасары)
Бенберин В.В., проф., академик (Қазақстан)
Березин В.Э., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Величкин В.И. проф., корр.-мүшесі (Ресей)
Вольдемар Вуйцик проф. (Польша)
Елешев Р.Е., проф., академик (Қазақстан)
Жамбакин Қ.Ж., проф., академик (Қазақстан)
Иванов Н.П., проф., академик (Қазақстан)
Илолов М.И. проф., академик (Тәжікстан)
Кригер Виктор проф. (Германия)
Кененбаев С.Б., проф., академик (Қазақстан)
Леска Богуслава проф. (Польша)
Локшин В.Н. проф., академик (Қазақстан)
Неклюдов И.М. проф., академик (Украина)
Нур Изура Удзир проф. (Малайзия)
Нургожин Т.С., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Перни Стефано проф. (Ұлыбритания)
Потапов В.А. проф. (Украина)
Прокопович Полина проф. (Ұлыбритания)
Рамазанов Т.С. проф., академик (Қазақстан)
Раманкулов Е.М., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Садықұлов Т., проф., академик (Қазақстан)
Семенов В.Г., проф., академик (Россия)
Сикорски Марек проф., (Польша)
Такибаев Н.Ж. проф., академик (Қазақстан), бас ред. орынбасары
Уразалиев Р.А., проф., академик (Қазақстан)
Харин С.Н. проф., академик (Қазақстан)
Харун Парлар проф. (Германия)
Чечин Л.М. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Энджун Гао проф. (Қытай)

«Қазақстан Республикасы Ұлттық ғылым академиясының баяндамалары»

ISSN 2518-1483 (Online),

ISSN 2224-5227 (Print)

Меншіктенуші: «Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы» Республикалық қоғамдық бірлестігі (Алматы қ.).

Қазақстан Республикасының Ақпарат және қоғамдық даму министрлігінің Ақпарат комитетінде 29.07.2020 ж. берілген № KZ93VPY00025418 мерзімдік басылым тіркеуіне қойылу туралы куәлік.

Тақырыптық бағыты: *наноматериалдар алу, биотехнология және экология саласындағы бірегей зерттеу нәтижелерін жариялау.*

Мерзімділігі: жылына 6 рет.

Тиражы: 500 дана.

Редакцияның мекенжайы: 050010, Алматы қ., Шевченко көш., 28; 219, 220 бөл.; тел.: 272-13-19, 272-13-18,
<http://reports-science.kz/index.php/en/archive>

© Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы, 2020

Типографияның мекенжайы: «NurNaz GRACE», Алматы қ., Рысқұлов көш., 103.

Главный редактор
д.х.н., проф., академик НАН РК
М. Ж. Журинов

Редакционная коллегия:

Адекенов С.М. проф., академик (Казахстан) (зам. гл. ред.)
Бенберин В.В., проф., академик (Казахстан)
Березин В.Э., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Величкин В.И. проф., чл.-корр. (Россия)
Вольдемар Вуйцик проф. (Польша)
Елешев Р.Е., проф., академик (Казахстан)
Жамбакин К.Ж., проф., академик (Казахстан)
Иванов Н.П., проф., академик (Казахстан)
Илолов М.И. проф., академик (Таджикистан)
Кригер Виктор проф. (Германия)
Кененбаев С.Б., проф., академик (Казахстан)
Леска Богуслава проф. (Польша)
Локшин В.Н. проф., академик (Казахстан)
Неклюдов И.М. проф., академик (Украина)
Нур Изура Удзир проф. (Малайзия)
Нургожин Т.С., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Перни Стефано проф. (Великобритания)
Потапов В.А. проф. (Украина)
Прокопович Полина проф. (Великобритания)
Рамазанов Т.С. проф., академик (Казахстан)
Раманкулов Е.М., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Садыкулов Т., проф., академик (Казахстан)
Семенов В.Г., проф., академик (Россия)
Сикорски Марек проф., (Польша)
Такибаев Н.Ж. проф., академик (Казахстан), зам. гл. ред.
Уразалиев Р.А., проф., академик (Казахстан)
Харин С.Н. проф., академик (Казахстан)
Харун Парлар проф. (Германия)
Чечин Л.М. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Энджун Гао проф. (Китай)

Доклады Национальной академии наук Республики Казахстан»

ISSN 2518-1483 (Online),

ISSN 2224-5227 (Print)

Собственник: Республиканское общественное объединение «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы).

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации Министерства информации и общественного развития Республики Казахстан № **KZ93VPY00025418**, выданное 29.07.2020 г.

Тематическая направленность: *публикация оригинальных результатов исследований в области получения наноматериалов, биотехнологии и экологии.*

Периодичность: 6 раз в год.

Тираж: 500 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28; ком. 219, 220; тел. 272-13-19, 272-13-18,

<http://reports-science.kz/index.php/en/archive>

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2020 г.

Адрес типографии: «NurNaz GRACE», г. Алматы, ул. Рыскулова, 103.

E d i t o r i n c h i e f

doctor of chemistry, professor, academician of NAS RK

M.Zh. Zhurinov

E d i t o r i a l b o a r d :

Adekenov S.M. prof., academician (Kazakhstan) (deputy editor in chief)
Benberin V.V., prof., academician (Kazakhstan)
Berezin V.Ye., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Velichkin V.I. prof., corr. member (Russia)
Voitsik Valdemar prof. (Poland)
Eleshev R.E., prof., academician (Kazakhstan)
Zhambakin K.Zh., prof., academician (Kazakhstan)
Ivanov N.P., prof., academician (Kazakhstan)
Iolov M.I. prof., academician (Tadjikistan)
Krieger Viktor prof. (Germany)
Kenenbayev S.B., prof., academician (Kazakhstan)
Leska Boguslava prof. (Poland)
Lokshin V.N. prof., academician (Kazakhstan)
Nekludov I.M. prof., academician (Ukraine)
Nur Izura Udzir prof. (Malaysia)
Nurgozhin T.S., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Perni Stephano prof. (Great Britain)
Potapov V.A. prof. (Ukraine)
Prokopovich Polina prof. (Great Britain)
Ramankulov E.M., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Sadykulov T., prof., academician (Kazakhstan)
Semenov V.G., prof., academician (Russia)
Sikorski Marek prof., (Poland)
Ramazanov T.S. prof., academician (Kazakhstan)
Takibayev N.Zh. prof., academician (Kazakhstan), deputy editor in chief
Urazaliev R.A., prof., academician (Kazakhstan)
Kharin S.N. prof., academician (Kazakhstan)
Kharun Parlar prof. (Germany)
Chechin L.M. prof., corr. member (Kazakhstan)
Endzhun Gao prof. (China)

Reports of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.**ISSN 2224-5227****ISSN 2518-1483 (Online),****ISSN 2224-5227 (Print)**

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty).

The certificate of registration of a periodical printed publication in the Committee of information of the Ministry of Information and Social Development of the Republic of Kazakhstan No. **KZ93VPY00025418**, issued 29.07.2020.Thematic scope: *publication of original research results in the field of obtaining nanomaterials, biotechnology and ecology.*

Periodicity: 6 times a year.

Circulation: 500 copies.

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,

<http://reports-science.kz/index.php/en/archive>

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2020

Address of printing house: «NurNaz GRACE», 103, Ryskulov str, Almaty.

УДК 577.29

Г.Д. Ильгекбаева, Е.Ш. Махашов, Г. Тулепова, Д. Есимханкызы, С.Т. Садиев

Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан.
E-mail: sadiev15@mail.ru**ЭКСПРЕССИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА *BRUCELLA ABORTUS* OMP16 В РАСТЕНИИ *NICOTIANA BENTHAMIANA***

Аннотация. Бруцеллез – одно из самых заразных и инфекционных заболеваний с высокими показателями заболеваемости крупного рогатого скота и человека в Казахстане. Использование современных биотехнологических методов для разработки надежных и доступных для фермеров вакцин является альтернативой для решения проблемы.

В качестве вектора для получения экспрессии антигенов возбудителя заболевания часто используют вирусы растений. Среди растительных вирусов широко используется вирус А винограда (ВАВ). При разработке вакцин или диагностических тестов против бруцеллеза, мембранные белки бруцеллы являются основными объектами исследований.

Мембранные белки (OMPs) являются специфическими поверхностными антигенами клетки, которые обладают иммуногенностью. OMPs являются идеальными кандидатами для производства рекомбинантных вакцин против бруцеллеза.

Объектом исследования являлся белок наружной мембраны (Omp16), который играет важную роль в подавлении выработки TNF- α в макрофагах. В данном исследовании было проведено молекулярное клонирование и анализ экспрессии гена Omp16, которая использована для экспрессии рекомбинантного белка в растениях. В качестве объектов исследований нами были выбраны бруцеллы из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 и растение *Nicotiana benthamiana*, который широко используется для производства целевого белка и является модельным растением для молекулярно-генетических исследований. Был сконструирован вирусный вектор для экспрессии бруцеллезного антигена Omp16 в растения *Nicotiana benthamiana*. Для регенерации трансгенных растений использовалось 19 эксплантов. В результате исследований внесенный ген Omp16 под контроль субгеномного промотора OPC4 успешно экспрессировался с сохранением эффективности экспрессии в трансгенных растениях. Эффективность вирусных векторов оценивалась на уровне транскрипции экспрессии мембранного белка Omp16 и вирусных белков. Инfiltrацию проводили всей листовой пластинки полностью, плотность агробактерий составила 0.7. Были получены трансгенные растения *Nicotiana benthamiana*, несущие ген капсидного белка ВАВ, была достигнута экспрессия мембранного антигена бруцеллы Omp16 в вирусном векторе путем замены OPC4 на ген Omp16. Разработка трансгенных растений была осуществлена с помощью агробактериальной трансформации.

Ключевые слова: *Brucella abortus* 19, мембранные белки, Omp16, экспрессия генов, рекомбинантные белки.

Введение. Бруцеллез – одно из самых заразных и инфекционных заболеваний с высокими показателями заболеваемости крупного рогатого скота и человека в Казахстане. Использование современных биотехнологических методов для разработки надежных и доступных для фермеров вакцин является альтернативой для решения проблемы. Поэтому в последние годы становятся популярными вакцины, разработанные на основе растений, благодаря многим преимуществам, которыми они обладают.

В зависимости от поставленной цели растения модифицируют для получения стабильной или временной экспрессии целевого белка. Хиатт с коллегами в 1989 году, работая над растительной вакциной, доказали, что использование растений для создания субъединичных вакцин является решением проблем, с которыми сталкиваются при производстве традиционных вакцин (1,2). Табак,

картофель, помидоры, кукуруза и рис являются растениями, которые на текущий момент используются в качестве природного «биореактора». Было произведено несколько вакцин на растительной основе, некоторые из которых в настоящее время проходят стадию клинических испытаний.

В качестве вектора для получения экспрессии антигенов возбудителя заболевания часто используют вирусы растений. Среди растительных вирусов широко используется вирус А винограда (ВАВ). Отечественными учеными был разработан вирусный вектор на основе ВАВ, где гетерологичные гены находились под контролем субгеномного промотора открытой рамки считывания 2 (ОРС2), хотя большая экспрессия была получена при встраивании гетерологичных генов под контроль субгеномного промотора ОРС4. К гетерологичным генам относятся ген усиленного флуоресцентного белка и ген капсидного белка вируса хлоротической пятнистости листьев яблони (3). При разработке вакцин или диагностических тестов против бруцеллеза мембранные белки бруцеллы являются основными объектами исследований.

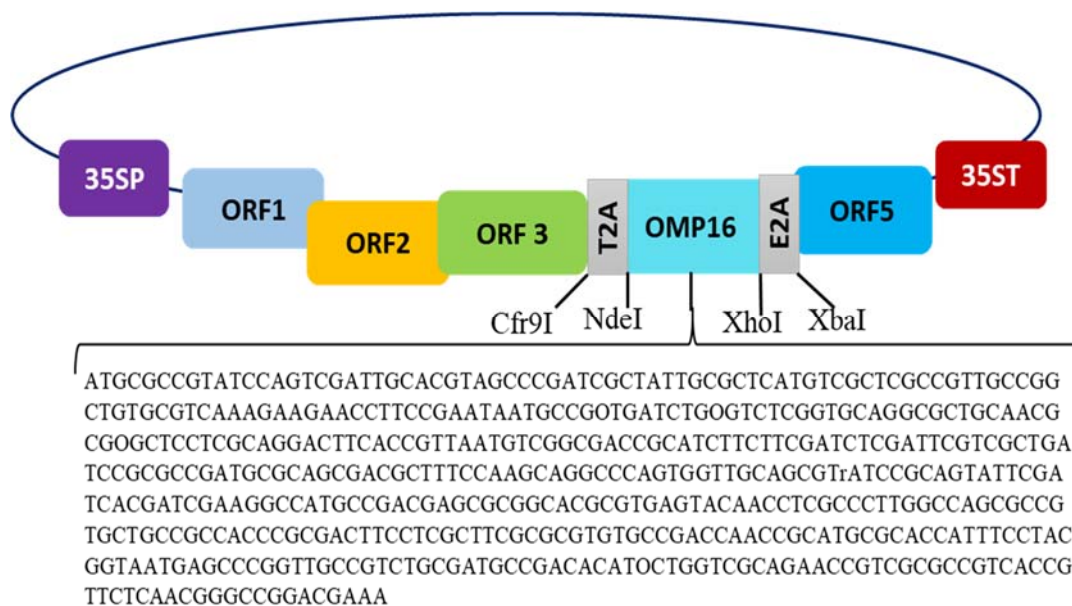
Мембранные белки (OMPs) являются специфическими поверхностными антигенами клетки, которые обладают иммуногенностью. OMPs являются идеальными кандидатами для производства рекомбинантных вакцин против бруцеллеза (4). OMP *Brucella abortus* S99 способствуют синтезу высоких уровней специфических молекул IgG против *Brucella* у кроликов при введении с липополисахаридом (LPS). С помощью моноклональных антител были обнаружены три основных и четыре малых белков наружной мембраны *Brucella abortus* и *Brucella melitensis* (5). Мембранный белок размером 16 кДа, названный Omp16, показывает значительное сходство с пептидогликан-ассоциированными липопотеидами (PAL) многих грамотрицательных бактерий (6). Двухвалентная слитая ДНК-вакцина, кодирующая белок *B. abortus* L7/L12 и белок Omp16, вызывала у мышей линии BALB *in vitro* Th1-доминантный иммунный ответ и значительный уровень защиты от заражения вирулентным штаммом *B. abortus* 544. В этом исследовании прокариотический вектор экспрессии, рЕТ-19b-Omp16, был индуцирован для экспрессии в *E.coli*. Экспрессию рекомбинантных белков можно быстро получить, используя прокариотические системы (7).

Объектом исследования являлся белок наружной мембраны (*Omp16*), который играет важную роль в подавлении выработки TNF- α в макрофагах. В данном исследовании было проведено молекулярное клонирование и анализ экспрессии гена *Omp16*, которая использована для экспрессии рекомбинантного белка в растениях. В качестве объектов исследований нами были выбраны бруцеллы из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19, и растение *Nicotiana benthamiana* который широко используется для производства гетерологичного белка и является модельным растением для молекулярно-генетической исследований.

Материалы и методы. Как сообщалось ранее, субклонирование этого гена проводили с использованием вектора рЕТ-19b, и для трансформации клеток был использован штамм TOP10F *Escherichia coli* (*E. coli*). Ген Omp *Omp16* размером 642 п.о. был амплифицирован методом ПЦР и успешно проклонирован. Результаты экспрессии были подтверждены с помощью секвенирования и анализа электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), который показал правильную полосу белка в 16.5 кДа (8). Клонирование, лигирование, подготовка компетентных клеток и трансформация проведены согласно общепринятым методам молекулярной биологии (9). Для подтверждения нуклеотидной последовательности мы просеквенировали полученный ген Omp16 с помощью анализатора Ion S5 (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование продукта клонирования подтвердило целостность клонирования.

На следующем этапе ген Omp16, кодирующий поверхностный антиген *Brucella abortus* 19, был проклонирован в векторную плазмиду рGEM3zf+ для последующей сборки с промежуточными конструкциями, необходимыми для получения экспрессии целевого белка в растениях *Nicotiana benthamiana*. Вектор рCASSgva был любезно предоставлен Институтом биологии и биотехнологии растений МОН РК (10). Для клонирования и субклонирования в работе были использованы следующие плазмиды: рGEM3zf+ и рЕТ-19b. Агрофильтрацию растений осуществляли путем использования штамма *EHA105 Agrobacterium tumefaciens*.

Растения *Nicotiana benthamiana* были использованы для получения экспрессии бруцеллезного антигена Omp16 с помощью разработанных вирусных векторов на основе вируса А винограда. Для проведения работ использовались стандартные реактивы и ферменты, предназначенные для генно-инженерных методов (9).



Стратегия конструирования вирусного вектора для экспрессии бруцеллезного антигена Omp16 в растениях *Nicotiana benthamiana*

При трансформации растений с использованием агробактерий семена растений *Nicotiana benthamiana* обрабатывались 10% раствором отбеливателя с добавлением 0,1 % Tween 20 в течение 20 мин. После промывания 10-15 семян располагали в боксы, содержащих твердую MSg среду. Растения из семян выращивали в течение 3-4 недель при 28⁰С и 16- часовом световом периоде. Ежедневно проверялся уровень роста агробактерий. Культивирование эксплантов на среде с антибиотиками осуществлялось в течение 10-20 дней, далее экспланты снова пересаживались на свежую питательную среду и культивировались несколько недель, за это время происходило формирование каллуса. Побеги аккуратно отделялись от каллуса и нижних листков с помощью стерильного скальпеля. 4 побега располагали в один Magenta бокс. Корни начали формироваться через 3-4 недели культивирования. После формирования 3-5 корней длиной 2 см регенеранты готовили для пересадки в почву.

Растения, перенесенные в почву, накрывались пластиковыми колпаками с отверстиями для прохождения воздуха.

Вектор pSAMgva был использован для трансформации агробактерий методом замораживания/оттаивания. Отобранные колонии агробактерий проверялись на наличие конструкций методом ПЦР с соответствующими праймерами.

Анализ экспрессии капсидного белка ВАВ и Omp16 был осуществлен с помощью Вестерн блоттинга. Белки выделялись из тех же листьев, что и РНК. Белки были выделены методом, основанном на использовании мочевины. Кроме того, анализ экспрессии Omp16 в листьях осуществлялся с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии на микроскопе Leica TCS SP8 (Leica MICROSYSTEMS) и с помощью флуоресцентной микроскопии на микроскопе EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific). Статистическая обработка данных проводилась путем высчитывания Байесовского фактора (minBF) в программе Matlab (11).

Обсуждение результатов. В результате исследований был разработан вектор на основе полного генома ВАВ путем внесения гена Omp16 под контроль субгеномного промотора OPC4. Стратегия разработки вектора изображена на рисунке. Гетерологичный ген располагался между OPC4 и OPC5 (12). Стоп-кодны капсидного белка ВАВ и целевого белка были удалены. Экспрессия мембранного белка происходила через 3'-терминальную субгеномную РНК, соответствующую капсидному белку ВАВ в немодифицированном геноме. Разделение мембранного белка и вирусных белков осуществлялось с помощью 2А пептидов, внесенных между капсидным белком ВАВ и мембранным белком. Модифицированная часть генома ВАВ была перенесена в вектор pSAMgva по сайтам AatII и SalI. Анализ на наличие рекомбинантных векторов проводили с помощью ПЦР, использовались праймеры, специфичные для КБ ВХПЛЯ и Omp16.

Эффективность вирусных векторов оценивалась на уровне транскрипции экспрессии мембранного белка Omp16 и вирусных белков. Инfiltrацию проводили полностью всей листовой пластинки, плотность агробактерий составила 0.7. Были получены трансгенные растения *Nicotiana benthamiana*, несущие ген капсидного белка ВАВ, и была достигнута экспрессия мембранного антигена бруцеллы Omp16 в вирусном векторе путем заменой ORC4 на ген Omp16. Разработка трансгенных растений была осуществлена с помощью агробактериальной трансформации. Для регенерации трансгенных растений использовалось 19 эксплантов. Побеги размером 1-2 см в длину пересаживали на среду для формирования корней. После появления 2-3 корней регенерантное растение переносили в почву для адаптации и получения семян. Анализ экспрессии мембранного белка осуществлялся с помощью иммуноблоттинга с использованием первичных антител к целевому белку. Кроме того, экспрессия Omp16 в векторе анализировалась флуоресцентной конфокальной микроскопией на 4-ый день после агроинfiltrации.

В результате исследований внесенный ген Omp16 под контроль субгеномного промотора ORC4 успешно экспрессировался с сохранением эффективности экспрессии в трансгенных растениях. Вирусный вектор можно использовать для экспрессии других бруцеллезных мембранных антигенов, таких как Omp25 или Omp31 в трансгенных растениях, согласно отработанной нами протоколу.

Разработка векторов на основе геномов вирусов для экспрессии мембранных белков бруцеллы является актуальной в виду ряда причин. Во-первых, появилась возможность наработки большого количества бруцеллезных антигенов, необходимых для разработки вакцин и диагностических препаратов. Причем эти антигены, полученные на основе растений, свободные от патогенов животных, обладают дешевой культивирования растений и возможностью быстрого масштабирования производства.

Г.Д. Илгекбаева, Е.Ш. Махашов, Г. Төлепова, Д. Есімханқызы, С.Т. Садиев

Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

**NICOTIANA BENTHAMIANA ЗАУЫТЫНДАҒЫ
БЕТТІК АНТИГЕНДІ BRUCELLA ABORTUS OMP16 БІЛІМІ**

Аннотация. Бруцеллез – Қазақстандағы ірі қара мал мен адам жиі ауыратын жұқпалы және инфекциялық аурудың бірі. Фермерлерге сенімді және қолжетімді вакцина жасау үшін заманауи биотехнологиялық әдістерді қолдану аталған мәселені шешудің баламалы жолы болып саналады.

Өсімдік вирустары көбінесе қоздырғыш антиген экспрессиясын алу үшін вектор ретінде қолданылады. Өсімдік вирусының ішінде жүзім вирусы А (ВАВ) кеңінен пайдаланылады. Бруцеллезге қарсы вакцина немесе диагностикалық мәтін жасауда бруцелланың мембраналық ақуызы зерттеудің негізгі объектісі болып саналады.

Мембраналық ақуыздар (ОМР) – иммуногендік клеткаларға тән беттік антигендер. ОМР – рекомбинантты бруцеллез вакциналарын өндіруге өте қолайлы кандидаттар.

Зерттеу нысанына макрофагтағы TNF- α өндірісін басуда маңызды рөл атқаратын сыртқы мембраналық ақуыз (Omp16) алынды. Бұл зерттеуде молекулалық клондау және өсімдіктердегі рекомбинантты ақуызды экспрессиялау үшін пайдаланылған Omp16 ген экспрессиясына талдау жасалды. Зерттеу нысандары ретінде бруцелланы *Brucella abortus* 19 вакцина штамынан және мақсатты ақуызды өндіруге кеңінен қолданылатын, молекулалық-генетикалық зерттеулердің үлгілі өсімдігі – *Nicotiana benthamiana* өсімдігінен таңдалды. Никотиана бентамиана өсімдігінде бруцеллез Omp16 антигенін экспрессиялау үшін вирустық вектор құрылды. Трансгенді өсімдік регенерациясы үшін 19 эксплант қолданылды. Зерттеу нәтижесінде ORF4 субгеномдық промоторының бақылауы негізінде енгізілген Omp16 гені трансгенді өсімдіктегі экспрессия тиімділігін сақтау арқылы көрінді. Вирустық вектор тиімділігі Omp16 мембраналық протеин мен вирустық белок экспрессиясының транскрипциясы деңгейінде бағаланды. Барлық жапырақ тақтасы инfiltrацияланған, агробактериялардың тығыздығы 0,7. ВАВ капсидті ақуызының генін алып жүретін трансгенді өсімдіктер алынды, ал никотиана бентамиана және вирустық вектордағы бруцеллалардың Omp16 мембраналық антиген экспрессиясына ORF4-ті Omp16 генімен алмастыру арқылы қол жеткізілді. Трансгенді өсімдіктердің дамуы агробактериялды трансформацияны қолдану арқылы жүзеге асырылды.

Түйін сөздер: *Brucella abortus* 19, мембраналық ақуыздар, Omp16, гендік экспрессия, рекомбинантты белоктар.

G.D. Ilgekbaeva, E.Sh. Makhshov, G. Tulepova, D. Yessimkhankyzy, S.T. Sadiev

Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

**EXPRESSION OF THE SURFACE ANTIGEN *BRUCELLA ABORTUS* OMR16
IN *NICOTIANA BENTHAMIANA* PLANT**

Abstract. Brucellosis is one of the most contagious and infectious diseases with high incidence rates of cattle and humans in Kazakhstan. Using modern biotechnology techniques to develop vaccines that are reliable and affordable for farmers is an alternative solution to the problem.

Plant viruses are often used as a vector for obtaining the expression of antigens of the pathogen. The grape virus A (BAB) is widely used among plant viruses. *Brucella* membrane proteins are the main objects of this research for further development of vaccines or diagnostic tests against brucellosis,

Membrane proteins (OMPs) are cell specific surface antigens that are immunogenic. OMPs are ideal candidates for the production of recombinant brucellosis vaccines.

The object of the study was the outer membrane protein (Omp16), which plays an important role in the suppression of TNF- α production in macrophages. In this study, molecular cloning and analysis of the expression of the Omp16 gene, which was used to express the recombinant protein in plants, was carried out. We selected brucella from the vaccine strain of *Brucella abortus* 19, and the plant *Nicotiana benthamiana*, as the subjects for our research, since they widely used for the production of recombinant proteins, and they both appropriate for molecular genetic research. A viral vector was constructed to express the brucellosis antigen Omp16 in *Nicotiana benthamiana* plants. Nineteen explants were used for the regeneration of transgenic plants. As a result of this studies, the introduced gene of Omp16 was under the subgenomic promoter control of the ORF4 and was successfully expressed while maintaining the efficiency of expression in transgenic plants. The efficiency of viral vectors was evaluated at the level of transcription during expression of the protein Omp16 with viral proteins. The entire leaf blade was infiltrated; the density of *Agrobacteria* was 0.7. We were able to obtain transgenic plants *Nicotiana benthamiana* carrying the gene of capsid protein BAB, and the expression of the membrane antigen Omp16 in the viral vector was achieved by replacing the ORF4 with the Omp16 gene. The development of transgenic plants was carried out using agrobacterial transformation.

Key words: *Brucella abortus* 19, membrane proteins, Omp16, gene expression, recombinant proteins.

Information about authors:

Ilgekbaeva Gulnaz D., Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Department of Biological Safety, Faculty of Veterinary Medicine, KazNAU, Almaty, Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0001-7140-2961>;

Makhshov Edil Sh., candidate of Veterinary Sciences, Acting Professor, Department of Biological Safety, Faculty of Veterinary Medicine, KazNAU, Almaty, Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0003-1922-7144>;

Tulepova Gulmira, doctoral student, Department of Biological Safety, Faculty of Veterinary Medicine, KazNAU, Almaty, Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0002-0681-3788>;

Yessimkhankyzy Dana, master student, Department of Biological Safety, Faculty of Veterinary Medicine, KazNAU, Almaty, Kazakhstan; <https://orcid.org/0000-0001-7035-913X>;

Sadiev Sagypash T., director of the Center for Applied Agricultural Research, KazNAU, Almaty, Kazakhstan; sadiev15@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1470-2612>

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Saxena J., Rawat S. (2014). “Edible vaccines,” in *Advances in Biotechnology*, pp. 207–226.
- [2] V. Doshi V., H. Rawal H., and Mukherjee S. (2013). “Edible vaccines from GM crops: current status and future scope. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, vol. 2, no. 3, pp. 1–6.
- [3] Gritsenko D.A., Kenzhebekova R., Deryabina N.D., Galiakparov N.N. (2019). Development of a “deconstructed” vector based on the genome of grapevine virus A. *Plant Biotechnol Rep*. Vol. 13, Issue 2.
- [4] Cassataro J., Velikovskiy C.A., De la Barrera S., et al. (2005). *Infect Immun*. 73(10):6537-46.
- [5] Winter A. (1987). Outer membrane proteins of *Brucella*. *Ann Inst. Pasteur/Microbiol*. 1987. 138:87-89.
- [6] Tibor A., Weynants V., Denoel P., et al. (1994). Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to PAL lipoproteins. *Infect Immun*. 62:3633–3639.
- [7] Ермилова, Е.В. (2012). Молекулярные аспекты адаптации прокариот: монография/Е.В. Ермилова. 2-е изд., Санкт-Петербург: Химиздат, 342 с.
- [8] Ильгекбаева Г.Д., Махашов Е.Ш., Тулепова Г., Садиев С.Т. (2019). Клонирование и экспрессия белка наружной мембраны бруцеллы Omp16. Исследования, результаты. № 3 (83) ISSN 2304-3334.
- [9] Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. (1999) *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th edn., New York: Wiley.
- [10] Galiakparov N., Tanne E., Sela I., Gafny R. (2003). Functional analysis of the grapevine virus A genome//*Virology*. 003. V. 306. P.42-50.
- [11] Lewandowski, D.J., Dawson, W.O. (1998). Deletion of internal sequences results in tobacco mosaic virus defective RNAs that accumulate to high levels without interfering with replication of the helper virus//*Virology*. Vol. 251.P. 427-437.
- [12] Rubinson E., Galiakparov N., Radian S., et al. (1997). Serological detection of grapevine virus A using antiserum to a nonstructural protein, the putative movement protein//*Phytopathology*, Vol. 87. P. 1041-1045.

**Publication Ethics and Publication Malpractice
in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Cross Check <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

ISSN 2518-1483 (Online), ISSN 2224-5227 (Print)

<http://reports-science.kz/index.php/en/archive>

Редакторы: *М. С. Ахметова, Д. С. Аленов, А. Ахметова*

Верстка на компьютере *А. М. Кульгинбаевой*

Подписано в печать 12.10.2020.

Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.

8,5 п.л. Тираж 500. Заказ 5.