

Создание экспрессионного вирусного вектора с использованием синтетической ДНК последовательности

А.А. Болотина^{1*}, П.Ю. Меркулов^{1,2}, И.В. Киров^{1,2}

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

* boloti.anya@yandex.ru

Цель: Разработка подходов к созданию вирусных векторов растений и оценка их репликации в *Nicotiana benthamiana*.

Материалы и методы: ДНК последовательность генома вируса мозаики бамбука (BaMV) была синтезирована и клонирована в вектор pUC57. Затем ДНК последовательность BaMV была клонирована в бинарный вектор pGD121 под контролем 35S-промотора методом TEDA (T5 exonuclease-dependent assembly). Для оценки функциональности полученной конструкции растения *N. benthamiana* были агроинфильтрованы BaMV. Контрольным вариантом служили растения, инфицированные лишь буферным раствором. Наличие и уровень вирусных РНК в образцах оценивали с помощью обратной транскрипции с последующей ПЦР (ОТ-ПЦР).

Результаты: Результаты показывают, что клонирование последовательности BaMV в бинарный вектор pGD121 с помощью рестрикции и лигирования оказалось малоэффективным, что, вероятно, связано со значительной протяженностью геномной вставки (около 8000 п.н.). В отличие от этого подхода, метод TEDA обеспечил успешную сборку полной конструкции BaMV в бинарном векторе и позволил получить пять плазмид со вставкой ожидаемого размера. Проведенное нами нанопоровое секвенирование выделенных плазмид продемонстрировало, что только один из пяти клонов не содержал однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), по-видимому, возникших на этапе ПЦР-амплификации. Все пять клонов были использованы для агроинфильтрации растений. Наиболее выраженные симптомы вирусной инфекции, включая хлороз и угнетение роста, а также хорошо детектируемый уровень вирусной РНК (подтвержденный методом ОТ-ПЦР), мы наблюдали у растений, агроинфицированных агробактериями, содержащими плазмиду со вставкой без мутаций.

Выводы: высокую эффективность клонирования крупных вирусных вставок в бинарные векторы по сравнению с классическим лигированием по «липким концам». Современные методы синтеза протяженных последовательностей могут позволить быстро получить экспрессионный вирусный вектор, используя лишь знания о самой последовательности вирусного генома.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке программы «Приоритет 2030» (МФТИ, Физтех).