

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА СЛАДКОГО БЕЛКА ТАУМАТИНА II ИЗ *THAUMATOCOCCLUS DANIELLII* В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

Пушин А.С. *, Фирсов А.П., Долгов С.В.

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушкино, Россия; aspushin@rambler.ru*

Сладкий белок тауматин II впервые выделен из плодов западноафриканского растения *Thaumatococcus daniellii* Benth. Благодаря свойству сладости этот белок имеет важную практическую ценность. Тауматин II транслируется в виде предшественника (препротаумтина), содержащего N-концевой гидрофобный сигнальный пептид, состоящий из 22 а.к. остатков и C-концевой пептид, состоящий из 6 а.к. остатков. Целью наших исследований было изучить влияние удаления N- и C-сигнальных последовательностей препротаумтина на характер экспрессии тауматина в трансгенных растениях табака. Для этого были синтезированы несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующие разные формы тауматина: форму с удаленным C-концевым сигнальным пептидом; форму с удаленными N- и C-сигнальными пептидами; форму с удаленным N-концевым сигнальным пептидом. В качестве контроля использовали ген *thaumatin II*, кодирующий препротаумтин. Все нуклеотидные последовательности клонировали в бинарный вектор pBI121 вместо гена *uidA*. Полученные векторы переносили в агробактериальный штамм CBE21 для трансформации растений табака. Отобранные трансгенные линии табака использовали для анализа. Анализ экспрессии гена тауматина при помощи иммуноблотинга с применением поликлональных антител, специфичных к тауматину, показал следующие результаты. При наличии N- и C-сигнальных последовательностей тауматин накапливался внутриклеточно (предположительно в вакуолях). Продукт немодифицированного гена соответствовал по подвижности зрелому белку, что свидетельствует о прохождении процессинга. Удаление C-концевого гексапептида, приводит к секреции тауматина в межклеточное пространство (апопласт), при этом процессинг проходит корректно. Органолептический анализ показал, что синтезированный тауматин обладал сладким вкусом. Это свидетельствует о сохранении нативной конформации тауматина при накоплении как внутриклеточно, так и в апопласте. Удаление обоих сигнальных пептидов или только N-концевого существенно снижает уровень накопления тауматина. Количественный иммуноферментный анализ показал, что уровень накопления тауматина в листьях трансгенного табака варьировал между линиями. В растениях содержащих форму тауматина с N- и C- сигналами количество тауматина доходило до 0,57% от общего растворимого белка. В растениях, у которых тауматин был с удаленным C-концевым сигналом, количество доходило до 0,43%. Напротив, в растениях содержащих формы тауматина с удаленным N-концевым сигналом, тауматин практически не определялся (менее 0,0001%). Полученные данные могут быть использованы при создании растительной экспрессионной системы для наработки рекомбинантного тауматина.