

БИОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, ЭКОЛОГИЯ

УДК 581.1:602.6

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ РОСТА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ

А. А. Загорская, научный сотрудник
Ю. В. Сидорчук, кандидат биологических наук
Е. В. Дейнеко, доктор биологических наук, профессор

Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия
E-mail: zagorska@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: культуры растительных клеток, биотехнология, трансгенез, агробактериальная трансформация, рекомбинантный белок, GFP

Реферат. Введены в культуру *in vitro* семь видов двудольных растений, отобранных по способности к накоплению в вегетативных тканях высоких уровней общего растворимого белка. Для получения интенсивно растущего рыхлого каллуса, пригодного для получения суспензионной культуры, оптимизированы составы питательных сред и проведена оценка морфогенетических реакций различных типов эксплантов. При скрининге по способности к каллусообразованию семи видов двудольных растений установлено, что быстрорастущие суспензионные линии могут быть получены для клеток трех видов растений – *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota*, *Amaranthus hypochondriacus* с применением отмеченных протоколов сред и типов эксплантов. На основании оценки ростовых характеристик суспензионных культур, полученных из каллусов трех выделенных видов растений, установлено, что все три анализируемые клеточные линии характеризовались высокими показателями жизнеспособности и интенсивным приростом биомассы. Результаты сравнительного анализа прироста биомассы у трех анализируемых клеточных культур выявили, что в наибольшей степени плотность клеток возрастала в суспензионной культуре *A. hypochondriacus*. С применением репортерного *gfp*-гена отобранные клеточные линии оценены по способности к накоплению рекомбинантного белка. Отмечена прямая корреляция между накоплением общего растворимого и рекомбинантного белков в клетках суспензионной культуры. Клеточные культуры, полученные на основе указанных трех видов растений, представляют интерес для биотехнологии и будут использованы при создании линий-продуцентов рекомбинантных белков, в том числе и медицинского назначения.

OPTIMIZATION OF CELL LINES GROWTH PARAMETERS OF SOME DICOTYLEDONOUS PLANTS CULTURED IN SUSPENSION CULTURE

A.A. Zagorskaya
Yu.V. Sidorchuk, Ph.D
E. V. Deineko, Ph.D, Prof.

Institute of Cytology and genetics, Siberian branch of RAS, Novosibirsk, Russia

Key words: Plant cell culture, biotechnology, transgenesis, agrobacterial transformation, recombinant protein, GFP.

Abstract. Seven species of dicotyledonous plants selected for their ability to accumulate high levels of total soluble protein in vegetative tissues were introduced into *in vitro* culture. To obtain an intensively growing

loose callus, suitable for the preparation of a suspension culture, nutrient media compositions were optimized and the morphogenetic reactions of various types of explants were evaluated. After screening for the ability of callus formation of seven species of dicotyledonous plants, it was established that fast-growing suspension lines can be obtained for the cells of three plant species – Nicotiana tabacum, Daucus carota, Amaranthus hypochondriacus, using the noted protocols of media and explant types. Based on the evaluation of the growth characteristics of the suspension cultures obtained from the calli of the three isolated plant species, it was established that all three cell lines analyzed were characterized by high viability and intensive biomass increment. The results of a comparative analysis of the growth of biomass in the three analyzed cell cultures revealed that the cell density increased most in the suspension culture of A. hypochondriacus. Using the reporter gfp-gene, the selected cell lines were evaluated for their ability to accumulate a recombinant protein. A direct correlation was observed between the accumulation of total soluble and recombinant proteins in the cells of the suspension culture. Cell cultures obtained on the basis of these plant species are of interest for biotechnology and will be used to create production lines for recombinant proteins, including medicinal products.

Для медицинских целей растения используются человеком уже многие тысячи лет. Однако на рубеже XXI в. с помощью методов генетической инженерии стало возможным создавать новые типы растений, в тканях которых могут синтезироваться и накапливаться белки из различных гетерологичных систем. Привлекательность растений в качестве систем экспрессии рекомбинантных фармацевтически ценных белков обеспечивается многими обстоятельствами. Прежде всего, в растительных тканях нет риска загрязнения рекомбинантного белка патогенами животного происхождения – вирусами и прионами. Растительные клетки обеспечивают правильную посттрансляционную модификацию рекомбинантного белка, характерную для эукариотических клеток [1].

Перспективной системой для биопroduкции рекомбинантных биофармацевтиков являются растительные клетки, культивируемые в биореакторах. Выращивание растительных клеток *in vitro* в контролируемых условиях позволяет обеспечивать клеточный рост и продукцию белка цикл за циклом в соответствии с требованиями GMP (Good Manufacturing Practice – надлежащая производственная практика). Новый этап в развитии данной технологической платформы был стимулирован появлением на рынке биофармацевтиков первого рекомбинантного белка талиглюциразы альфа, синтезированного в суспензионной культуре клеток моркови и используемого при лечении болезни Гоше [2].

В настоящее время на рынке биофармацевтиков насчитывается более 200 рекомбинантных белков, используемых для лечения и профилактики диабета, анемии, гепатита, некоторых видов рака, сердечно-сосудистых заболеваний и еще около 400 белков находятся в разработке. Большая часть биофармацевтиков синтезируются в куль-

турах бактерий и клеток млекопитающих. Так, например, около 60% рекомбинантных белков в США и Европе синтезируются в эукариотических системах экспрессии, из которых около 35% приходится на долю клеток китайского хомячка и 15% – на долю клеток дрожжей. Получение рекомбинантных белков в растительных системах экспрессии, в частности, в культуре растительных клеток, представляется перспективным в силу сниженной себестоимости такой продукции, безопасности и высокого качества синтезируемого рекомбинантного белка [3].

В настоящее время растительные клетки, культивируемые в биореакторах, используются в биофармацевтике в качестве сырья для получения вторичных метаболитов. Несмотря на перспективность применения растительных клеток для синтеза рекомбинантных белков, в том числе и медицинского назначения, в этой области все еще остается немало нерешенных проблем, наиболее важной среди которых является низкий уровень выхода рекомбинантного белка.

Наиболее известные растительные клеточные линии – биопroduценты рекомбинантных белков – представлены клетками табака (*Nicotiana tabacum*), такими, как линия BY-2 (*N. tabacum* cv. Bright Yellow 2) [4] и линия NT-1 (*N. tabacum*-1) [5]. Их отличают быстрый рост, синхронизация клеточного цикла, а также высокая восприимчивость к агробактериальной трансформации. Другие используемые клеточные линии получены в основном на основе съедобных видов растений: моркови, риса, сои, томатов [1, 6, 7]. Такие линии более предпочтительны для использования по сравнению с клеточными линиями табака по причине низкого уровня побочных продуктов и по соответствию нормативным требованиям. Таким образом, проблема поиска новых видов растений, на основе которых можно было бы создать кле-

точные суспензионные культуры-продуценты, характеризующиеся высокой скоростью роста и высокими показателями накопления рекомбинантных белков, является весьма актуальной для биотехнологии.

Цель настоящей работы состояла в получении суспензионных клеточных линий на основе некоторых видов двудольных растений, способных к максимально высокому накоплению рекомбинантных белков, для возможного использования в дальнейшем в качестве платформы для синтеза белков медицинского назначения. Для достижения поставленной цели необходимо было ввести в культуру *in vitro* некоторые виды двудольных растений, провести сравнительный анализ их способности к максимально высокой скорости пролиферации каллусов и оценить отобранные клеточные линии по синтезу рекомби-

нантного белка на примере модельной системы с применением репортерного гена, кодирующего зеленый флюоресцирующий белок.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве исходного материала для введения в культуру *in vitro* было использовано семь видов двудольных растений, отобранных на основании данных литературы о способности к накоплению высоких уровней общего растворимого белка (ОРБ) в вегетативных тканях. Как видно из данных табл. 1, род *Glycine* был представлен двумя видами: *G. soja* и *G. max*, причем вид *G. max* – шестью образцами. Предпочтение этому виду было отдано на основании высоких значений показателей ОРБ и соответственно его потенциальной привлекательности в качестве биопродукта для получения ре-

Таблица 1

Образцы двудольных растений, отобранные по содержанию общего растворимого белка в зеленой массе
Samples of dicotyledonous plants, selected for their content of total soluble protein in green mass

Вид растения	Образец	Происхождение	Содержание ОРБ, %	Источник литературы
<i>Glycine max</i>	Омская 4	ОмСХИ	18–22	[8]
	Гармония	ВНИИ сои		
	Заря	ВНИИ сои		
	Алтом	СибНИИСХ		
	СибНИИК-315	СибНИИ кормов		
	СибНИИСХоз-6	СибНИИ кормов		
<i>Glycine soja</i>	Крупноплодный мутант MD	ИЦиГ СО РАН		
<i>Medicago varia</i>	Клон 868	ИЦиГ СО РАН	≈ 20	[9]
<i>Lupinus angustifolius</i>	Сорт Кристалл	ИЦиГ СО РАН	16–18	[10]
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Сорт Чергинский	ИЦиГ СО РАН	13–21	[11]
<i>Daucus carota</i>	Сорт Нантская 4	ВНИИССОК	9–11	[12]
<i>Nicotiana tabacum</i>	Линия SR1	ИЦиГ СО РАН	≈ 13	[13]

комбинантных белков в суспензионной культуре. Остальные отобранные для исследования виды были представлены единичными образцами.

Для индукции каллусогенеза и поддержания клеточных культур *in vitro* использовали стандартные среды MS [14] и B5 [15] и их модификации с сочетанием минеральных компонентов MS с витаминами по Гамборгу B-5 и дополненные регуляторами роста (табл. 2). В качестве эксплантов для индукции каллусов использовали котиленоны, гипокотили, эпикотили, семядольные узлы, семядоли, черешки, листья и зрелые зародыши семян.

Для получения клеточных суспензий фрагменты рыхлого каллуса (общей массой около 1,0 г),

сформировавшегося после 3–4 пассажей, переносили в колбы с 50 мл жидкой среды того же состава, что и среда для поддержания каллуса. Для удаления крупных агрегатов суспензии фильтровали через нейлоновые фильтры. Колбы с клеточными культурами помещали на платформу орбитального шейкера S-3L (ELMI, Латвия) при 170 об/мин. Через каждые две недели проводили пассирование исследуемых клеточных культур на свежие среды того же состава. При переносе клеточных суспензий на свежие среды проводили отбор проб для оценки ростовых характеристик каждой культуры.

Суспензионные культуры амаранта культивировали на свету при интенсивности освещения

Таблица 2

Варианты сред и типы эксплантов, используемые для индукции каллусов из отобранных видов двудольных растений

The options of media and types of explants used for induction of calli from selected species of dicotyledonous plants

Виды растений	Типы эксплантов	Состав среды
<i>G. max</i>	Котиледоны, гипокотили, эпикотили, семядольные узлы, семядоли	MS +2 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л кинетина MS +5 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л кинетина MS +1 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л кинетина MS +1 мг/л ИУК; 1 мг/л БАП MS + вит. В-5 +40 мг/л 2,4-Д
<i>G. soja</i>	Котиледоны, гипокотили, эпикотили, семядольные узлы, семядоли	MS +2 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л кинетина MS +5 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л кинетина MS +1 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л кинетина MS +1 мг/л ИУК; 1 мг/л БАП
<i>M. varia</i>	Котиледоны, гипокотили	В-5+2 мг/л 2,4-Д; 2 мг/л кинетина В-5+8 мг/л 2,4-Д; 8 мг/л кинетина; 0,5 мг/л НУК MS +5 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л кинетина MS +8 мг/л 2,4-Д; 8 мг/л кинетина; 0,5 мг/л НУК
<i>A. hypochondriacus</i>	Котиледоны, гипокотили, эпикотили, листья	MS +1 мг/л 2,4-Д; 0,5 мг/л кинетина MS +2 мг/л 2,4-Д; 2 мг/л кинетина MS +5 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л кинетина В-5+8 мг/л 2,4-Д; 8 мг/л кинетина; 0,5 мг/л НУК MS +8 мг/л 2,4-Д; 8 мг/л кинетина; 0,5 мг/л НУК MS +1 мг/л ИУК; 1 мг/л БАП MS +1 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л ИУК; 1 мг/л БАП
<i>L. angustifolius</i>	Котиледоны, гипокотили, эпикотили, семядольные узлы, листья	MS +1 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л ИУК; 1 мг/л БАП
<i>D. carota</i>	Зрелые зародыши	MS +0,2 мг/л 2,4-Д; 0,2 мг/л кинетина
<i>N. tabacum</i>	Стеблевые диски, черешки, листья	MS +0,5 мг/л ИУК; 1 мг/л кинетина MS +1 мг/л ИУК; 0,1 мг/л кинетина MS +0,1 мг/л ИУК; 1,0 мг/л БАП MS +1 мг/л ИУК; 0,3 мг/л БАП

20 тыс. лк и 16-часовом фотопериоде. Клеточные культуры остальных исследуемых видов растений культивировали в темноте.

Ростовые характеристики исследуемых клеточных суспензий оценивали по ростовому индексу (РИ), который определяли как прирост сухой биомассы клеток по двум точкам – на 10-й и 15-й дни культивирования суспензии относительно сухой биомассы клеток, используемых для начала культивирования. Значения ростового индекса рассчитывали по формуле

$$РИ = \frac{X - Y}{Y},$$

где X – среднее значение сухой биомассы клеток на 10-й либо 15-й дни культивирования, мг;

Y – среднее значение сухой биомассы клеток, взятых до начала культивирования клеток в суспензии, мг.

Для определения содержания сухого вещества в анализируемых образцах клеточную биомассу высушивали при температуре 50–55° С до воздушно-сухого состояния.

Плотность клеток в суспензии отдельных образцов определяли по стандартной методике [16] с одновременной оценкой жизнеспособности клеток путем их окрашивания трипановым синим. Количество клеток оценивали в камере Фукса-Розенталя. Подсчеты числа клеток проводили на 10-й и 15-й дни культивирования in vitro.

Для сравнительного анализа исследуемых клеточных линий по способности к накоплению

рекомбинантного белка использовали модельную систему с применением репортерного гена *gfp*, кодирующего зеленый флуоресцентный белок. Для этого с применением созданной нами ранее генетической конструкции проводили агробактериальную трансформацию каллусов по собственной методике [17]. В качестве контроля использовали нетрансгенные клеточные линии растений соответствующих исследуемых видов.

Содержание общего белка измеряли по стандартной методике М. Брэдфорд [18]. Калибровочную кривую строили, используя раствор БСА в концентрации от 5 до 150 мкг/мл. Для количественного анализа белка использовали фотокориметр КФК-2МП. Оптическую плотность измеряли при длине волны 595 нм. Содержание белка GFP в экстрактах определяли на приборе Victor³1420 Multilabel Counter.

Детекцию свечения GFP-белка в клетках суспензионных культур трех отобранных видов растений проводили с использованием микроскопа Axioskop 2 Plus (ZEISS, ФРГ) на увеличениях 200× и 400×. Микроскопирование проводили в проходящем свете и фазовом контрасте с комплектом интерференционных фильтров фирмы ZEISS № 24. Регистрацию изображений проводили с использованием цветной CCD-камеры AxioCam HRc (ZEISS, ФРГ). Для детекции свечения GFP использовали свежий растительный материал после 6 недель культивирования на селективных средах с антибиотиком гигромицином (20 мг/л). Поскольку растительные клетки обладают автофлуоресценцией, то для выявления свечения GFP-белка использовали фильтры с возбуждающей длиной волны 450–490 и 460–480 нм и эмиссией ≥520 и 505–530 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения морфогенетического потенциала в условиях культивирования *in vitro* были взяты различные органы и ткани растений, выращенных в асептических условиях (*G. max*, *G. soja*, *M. varia*, *A. hypochondriacus*, *L. angustifolius*, *N. tabacum*) или подвергнутых стерилизации (*D. carota*). Для получения интенсивно пролиферирующих каллусных линий были использованы различные условия, активно влияющие на рост культур *in vitro*: трофические и фитогормональные компоненты питательной среды, освещенность, а также изучено влияние типа экспланта на реге-

нерационный потенциал в культуре *in vitro*. При визуальном анализе и оценке прироста каллусной массы по трехбалльной шкале были выявлены оптимальные составы сред и концентрации фитогормонов, обеспечивающие наибольший прирост биомассы каллусов, а также формирование рыхлого каллуса, пригодного для перевода его в суспензионную культуру.

Показано, что во всех вариантах сред при использовании всех видов эксплантов *G. max* и *G. soja* формировался плотный каллус, непригодный для перевода его в суспензию и отличающийся низкой скоростью пролиферации. Напротив, во всех вариантах сред и всех эксплантах *M. varia* развивался рыхлый быстро растущий каллус. Для дальнейшей работы был выбран вариант среды, приведенный в табл. 3, на которой рост каллуса был наиболее интенсивным.

Для *A. hypochondriacus* скорость роста и тип каллуса определялись только составом среды и не зависели от типа экспланта, из которого каллус был индуцирован.

Эксперименты с *L. angustifolius* показали, что морфогенетический ответ отсутствовал лишь у одного типа эксплантов (настоящие листья). На остальных эксплантах этого вида растения формировался рыхлый каллус, различающийся по скорости пролиферации в зависимости от состава среды.

Рыхлый тип каллуса, максимально пригодный для использования его в целях получения суспензионной культуры, был получен из зародышей зрелых семян моркови.

Наибольшим разнообразием морфогенетических реакций отличались разные типы эксплантов *N. tabacum*: на средах одного и того же состава было отмечено побегообразование, ризогенез и формирование рыхлого каллуса в зависимости от типа экспланта. Стебловые диски, формирующие интенсивно растущий рыхлый каллус в варианте среды, приведенном в табл. 3, представляют интерес для дальнейшего использования в качестве эксплантов при создании клеточных линий *N. tabacum*.

Таким образом, в результате проведенного сравнительного анализа семи видов двудольных растений по способности к каллусообразованию были отобраны три вида растений (*N. tabacum*, *D. carota*, *A. hypochondriacus*), формирующие рыхлый, интенсивно пролиферирующий каллус, перспективный для создания суспензионной клеточной культуры.

Таблица 3

Состав сред и количество каллусов, индуцированных у различных видов растений
The medium composition and the number of calli induced from various plant species

Виды растений	Компоненты сред		Индуцировано каллусов
	базовая среда	регуляторы роста	
<i>G. max</i>	MS + вит. В-5	2 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л кинетина	1200
<i>G. soja</i>	MS + вит. В-5	40 мг/л 2,4-Д	280
<i>M. varia</i>	MS	5 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л кинетина	440
<i>A. hypochondriacus</i>	MS	1 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л ИУК; 1 мг/л БАП	1020
<i>L. angustifolius</i>	MS	1 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л ИУК; 1 мг/л БАП	750
<i>D. carota</i>	MS	0,2 мг/л 2,4-Д; 0,2 мг/л кинетина	1500
<i>N. tabacum</i>	MS	1 мг/л ИУК; 0,1 мг/л кинетина	280

Важными показателями, отражающими потенциальные возможности суспензионной культуры как биопродукта, являются скорость роста суспензии (РИ), плотность клеток в объеме среды для культивирования и жизнеспособность клеток. Данные по этим параметрам для трех отобранных видов растений (*N. tabacum*, *D. carota*, *A. hypochondriacus*), формирующих рыхлый, интенсивно пролиферирующий каллус, представлены в табл. 4.

Как видно из представленных в табл. 4 данных, жизнеспособность клеток у трех анализируемых культур была достаточно высокой: от 73% (*N. tabacum*) до 79% (*D. carota*). По данным литературы [19], жизнеспособность клеточных суспензий с хорошими показателями роста составляет около 70%. Таким образом, все три анализируемые клеточные суспензии имеют высокий показатель жизнеспособности клеток.

Таблица 4

Плотность, жизнеспособность клеток и РИ анализируемых суспензионных культур
Density, cell viability and RI of the analyzed suspension cultures

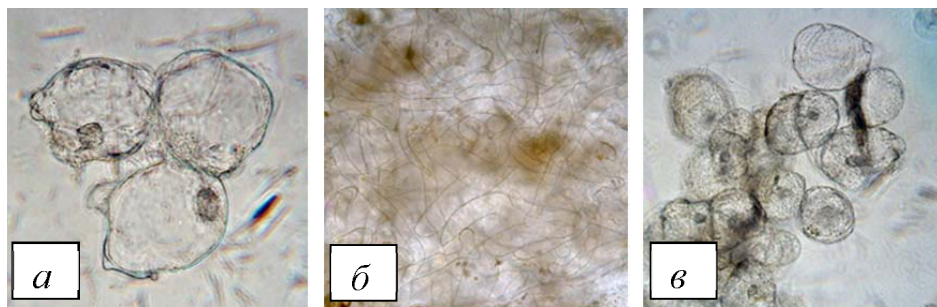
Культура	Плотность суспензии (число клеток в 1 мл суспензии)		Жизнеспособность клеток на 10-й день, %	РИ суспензии	
	10-й день	15-й день		10-й день	15-й день
<i>N. tabacum</i>	54300±4300	103541±7432	73,02± 3,41	3,6	4,4
<i>D. carota</i>	19100±1000	22300±1600	79,68 ± 4,12	3,6	5,2
<i>A. hypochondriacus</i>	14600±1600	79300±1800	76,24 ± 1,49	2,8	9,6

Интенсивный прирост биомассы наблюдался у всех трех анализируемых клеточных культур. Плотность клеток возрастала в наибольшей степени у *A. hypochondriacus* (в 5,4 раза). Для этого вида отмечен и наибольший прирост биомассы. Так, например, на 15-й день культивирования РИ клеток составил 9,6.

Известно, что при создании высокопродуктивных клеточных суспензий важно поддержание однородных по клеточному составу культур в гомогенном состоянии для равномерного их снабжения питательными веществами и кислородом. В связи с этим был проведен микроскопический анализ суспензионных культур клеток *N. tabacum*, *D. carota* и *A. hypochondriacus*. Установлено, что клеточные суспензии *D. carota* характеризовались значительной неоднородностью популяции клеток, состоящей из смеси клеток разного типа и размера с образованием клеточных агрегатов (рисунок, а). На долю мелких и средних клеток

округлой формы размером менее 50 мкм, наиболее предпочтительных в составе культивируемых клеточных суспензий, приходилось 38,2%.

В суспензионных культурах *A. hypochondriacus* не наблюдалось образования плотных клеточных агрегатов. Характерной особенностью клеточного состава суспензионных культур клеток этого вида растения было отсутствие группы мелких округлых клеток и преобладание (58,9%) крупных удлиненных клеток (см. рисунок, б), имеющих длину, равную в среднем 74,6±1,1 мкм. Такой клеточный состав суспензионной культуры не является удобным при создании высокопроизводительных культур, так как крупные удлиненные клетки вызывают реологические проблемы и проблемы перемешивания, оседают на дно и стенки реакционного сосуда, блокируя отверстия и функциональные блоки реактора, а кроме того, больше подвержены повреждениям при культивировании.



Микрофотографии суспензионных культур клеток:
а – *D. carota*; б – *A. hypochondriacus*; в – *N. tabacum*
Photomicrographs suspension cell cultures:
a – *D. carota*; b – *A. hypochondriacus*; the *N. tabacum*

Наибольшей однородностью отличалась суспензия клеток табака, состоящая из округлых клеток (см. рисунок, в) среднего (39,7%) или крупного (47,6%) размера и незначительного количества клеточных агрегатов.

Характер свечения белка GFP в клетках *D. carota* и *A. hypochondriacus*, полученных из суспензионных культур, не имел каких-либо отличий от свечения, детектируемого в клетках *N. tabacum*. Максимальная интенсивность сигнала GFP наблюдалась вокруг ядра и на периферии клеток. Это свидетельствовало о накоплении GFP-белка в клеточной цитоплазме, что особенно ярко проявлялось в сильно вакуолизированных клетках.

В табл. 5 представлены данные по содержанию белков (общего растворимого и рекомбинантного белка GFP) в экстрактах, выделенных из каллусных культур анализируемых видов растений.

Таблица 5

Содержание общего растворимого
и рекомбинантного белков в экстрактах
из каллусов исследуемых видов растений
Content of total soluble and recombinant proteins in
extracts from the calli of the studied plant species

Каллусы	Содержание общего растворимого белка, мг/г сырой массы	Содержание рекомбинантного белка GFP, мкг/мл экстракта
<i>D. carota</i>	$0,310 \pm 0,025$	$0,0210 \pm 0,0001$
<i>N. tabacum</i>	$0,360 \pm 0,042$	$0,0330 \pm 0,0002$
<i>A. hypochondriacus</i>	$1,010 \pm 0,071$	$0,0450 \pm 0,0002$

Представленные в табл. 5 данные показывают, что в каллусах *D. carota* и *N. tabacum* количество общего растворимого белка существенно не различалось и было равно $0,310 \pm 0,025$ и $0,360 \pm 0,042$ мг/г сырой массы соответственно. В каллусах *A. hypochondriacus* содержание белка втрое превышало данные значения и составляло 1,010

$\pm 0,071$ мг/г сырой массы. Содержание рекомбинантного белка GFP в клетках *D. carota* и *N. tabacum* также находилось примерно на одном уровне, а в клетках *A. hypochondriacus* было несколько выше и составляло $0,0450 \pm 0,0002$ мкг/мл экстракта. Отмечена прямая корреляция между накоплением общего растворимого и рекомбинантного белков в клетках суспензионной культуры *A. hypochondriacus*.

Таким образом, на основании результатов, полученных при оценке семи видов двудольных растений по способности к каллусообразованию, установлено, что быстрорастущие суспензионные линии с применением вышеописанных протоколов сред и типов эксплантов могут быть получены для клеток трех видов растений – *D. carota*, *N. tabacum* и *A. hypochondriacus*. Клеточные культуры, полученные на основе этих видов растений, представляют в дальнейшем интерес для биотехнологии при создании линий-продуцентов рекомбинантных белков, в том числе и медицинского назначения.

ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга различных типов эксплантов семи видов двудольных растений по индукции каллусообразования в культуре *in vitro* выделены три вида – *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota* и *Amaranthus hypochondriacus*, способные к образованию рыхлого, интенсивно пролиферирующего каллуса, перспективного для получения быстрорастущих клеточных линий в условиях суспензионной культуры.

2. На основании оценки ростовых характеристик суспензионных культур, полученных из каллусов трех выделенных видов растений, установлено, что все три анализируемые клеточные линии характеризовались высокими показателя-

ми жизнеспособности (73–79%) и интенсивным приростом биомассы.

3. Результаты сравнительного анализа прироста биомассы у трех анализируемых клеточных культур показали, что в наибольшей степени плотность клеток возрастала в суспензионной культуре *A. hypochondriacus* (в 5,4 раза) с увеличением ростового индекса на 15-й день до 9,6.

4. С применением репортерного *gfp*-гена отобранные клеточные линии оценены по спо-

собности к накоплению рекомбинантного белка. Отмечена прямая корреляция между накоплением общего растворимого и рекомбинантного белков в клетках суспензионной культуры *A. hypochondriacus*.

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта «Генетические основы биотехнологий и биоинформатика» (№ 0324–2016–0008).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Пермякова Н.В., Уварова Е.А., Дейнеко Е.В. Состояние исследований в области создания растительных вакцин ветеринарного назначения// Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 1. – С. 28–44.
2. Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture – the protalix experience / Y. Teokoah, A. Shulman, T. Kizhner [et al.] [Electronic resources] // Plant Biotechnology Journal. – 2015. – Vol. 13. – P. 1199–1208. – URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbi.12428/epdf>.
3. Persistence Market Research. Global Market Study on Biopharmaceuticals: Asia to Witness Highest Growth by 2020. – NY, 2015 [Electronic resources]. – URL: <http://www.persistencemarketresearch.com/market-research/biopharmaceutical-market.asp>.
4. Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S. Tobacco BY-2 cell line as the «HeLa» cell in the cell biology of higher plants// International Review of Cytology 132. – 1992. – P. 1–30.
5. Yang S.-T. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications. – Elsevier, 2011. – 684 p.
6. Production of functional recombinant bovine trypsin in transgenic rice cell suspension cultures / N.S. Kim, H.Y. Yu, N.D. Chung [et al.] [Electronic resources] // Protein Expr Purif. – 2011. – Vol. 76. – P. 121–126. – URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592810002846>.
7. Identification and characterization of a heat-inducible ftsH gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / A.Q. Sun, S.Y. Yi., Yang J.Y. [et al.] // Plant Sci. – 2006. – Vol. 170. – P. 551–562.
8. Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes / S. Sharma, M. Kaur, R. Goyal [et al.] // [Electronic resources] // J. Food Sci. Technol. – 2014. – Vol. 51, N 3. – P. 551–557. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3931876/>.
9. Горковенко Л.Г., Потехин С.А., Кондратьева Л.Ф. Рациональное использование протеина люцерны // Зоотехния. – 2010. – № 3. – С. 12–15.
10. Красовская А.В., Веремей Т.М. Сравнительное изучение зернобобовых культур в Западной Сибири// Изв. Оренбург. гос. аграр. ун-та. – 2010. – № 1 (25). – С.14–17.
11. Antioxidant activity and nutritional assessment of under-utilized medicinal plants / A.A. Shad, J. Bakht, H.U. Shah [et al.] // Pak. J. Pharm. Sci. – 2016. – Vol.29, N 6. – P. 2039–2045.
12. Quality of carrots as affected by pre- and postharvest factors and processing / R. Seljasen, H.L. Kristensen, C. Lauridsen [et al.] // Sci Food Agric. – 2013. – Vol.93, N 11. – P. 2611–2626.
13. Optimisation of contained *Nicotiana tabacum* cultivation for the production of recombinant protein pharmaceuticals. / R. Colgan, C.J. Atkinson [et al.] // Transgenic Res. – 2010. – Vol. 19, N 2. – P. 241–256.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures// Physiol Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
15. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells// Exp. Cell Res. – 1968. – Vol. 50. – P. 151–158.
16. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
17. Use of Transgenic Carrot Plants Producing Human Interleukin-18 for Modulation of Mouse Immune Reactions / U.V. Yakushenko, Yu.A. Hrapov, E.V. Deineko [et al.] // New research on Biotechnology and Medicine/ Eds.: A.M. Egorov, G.E. Zaikov. – Nova Science Publishers, NY, 2006. – 762 p.

18. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding// *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
19. Мокроносов А. Т., Березенкова Р. А. Методика количественной оценки структуры и функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов// *Тр. по приклад. ботанике, генетике и селекции.* – 1978. – Т. 61, вып. 3. – С. 119–133.

REFERENCES

1. Permyakova N.V., Uvarova E.A., Deineko E.V. *Fiziologiya rastenii*, 2015, vol.62, No 1, pp.28–44. (In Russ.)
2. Tekoah Y., Shulman A., Kizhner T., Ruderfer I., Fux L., Nataf Y., Bartfeld D., Ariel T., Gingis-Velitski S., Hanania U., Shaaltiel Y. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, Vol. 13, pp. 1199–1208. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbi.12428/epdf>
3. Persistence Market Research. Global Market Study on Biopharmaceuticals: Asia to Witness Highest Growth by 2020, NY, 2015. Available at: <http://www.persistencemarketresearch.com/market-research/biopharmaceutical-market.asp>
4. Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S. *International Review of Cytology*, vol. 132, 1992, pp. 1–30.
5. Yang S. – T. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications, Elsevier, 2011, 684 p.
6. Kim N.S., Yu H.Y., Chung N.D., Shin Y.J., Kwon T.H., Yang M.S. *Protein Expr. Purif.*, 2011, vol. 76, pp. 121–126. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592810002846>
7. Sun A., Yi S., Yang J., Zhao Ch., Liu J., *Plant Sci.*, 2006, vol. 170, pp. 551–562.
8. Sharma S. Kaur M., Goyal R., Gill B.S. *J. Food Sci. Technol.*, 2014, vol. 51, No 3, pp. 551–557. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3931876>.
9. Gorkovenko L.G., Potekhin S.A., Kondrat'eva L.F. *Zootekhniya*, 2010, No 3, pp. 12–15. (In Russ.)
10. Krasovskaya A.V., Veremei T.M. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2010, No 1 (25), pp.14–16. (In Russ.)
11. Shad A.A., Bakht J., Shah H. U., Hayat Y. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2016, vol.29, No 6, pp. 2039–2045.
12. Seljasen R., Kristensen H.L., Lauridsen C. *Sci. Food Agric.*, 2013, vol. 93, No 11, pp. 2611–2626.
13. Colgan R., Atkinson C.J. *Transgenic Res.*, 2010, vol.19, No 2, pp. 241–256.
14. Murashige T., Skoog F. *Physiol Plantarum*, 1962, vol. 15, pp. 473–497.
15. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. *Exp. Cell Res.*, 1968, vol. 50, pp. 151–158.
16. Pausheva Z.P. *Praktikum po tsitologii rastenii*, Moscow, Agropromizdat, 1988, 271p. (In Russ.)
17. Yakushenko U.V., Hrapov Yu.A., Deineko E.V. Use of Transgenic Carrot Plants Producing Human Interleukin-18 for Modulation of Mouse Immune Reactions, *New research on Biotechnology and Medicine*, Nova Science Publishers, NY, 2006, 762 p.
18. Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254.
19. Mokronosov A.T., Berezenkova A.T. *Tr. po priklad. botanike, genetike i seleksii*, 1978, vol. 61, issue 3, pp. 119–133. (In Russ.)