Engineering of vectors essential to derive chimeric proteins based on superfolder green fluorescent protein and harpins

Tchebotarev L., Valentovich L.

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E-mail: leuch@mbio.bas-net.by

Key message. Conjugation of harpins with green fluorescent protein is aimed at achieving enhanced solubility and stability of chimeric protein, facilitating qualitative and quantitative evaluation of its expression in the routine experiments.

Keywords: harpin, superfolder GFP, hypersensitive response, plant immunity, heterologous gene expression

In the course of heterologous expression of certain harpin genes [1] it becomes difficult to define conditions or production of sufficient amounts of protein in soluble form. Nevertheless, coupling harpins to green fluorescent protein (superfolder GFP) [2] may solve the problem of solubility and stability of chimeric protein and simplify qualitative and quantitative assessment of its expression level in the routine experiments. In the study [3] GFP fused with HrpZ_{Pss} did not affect immune response of tomato. However, the data are still scarce to estimate the capacity of sfGFP as chimeric protein component to modify plant hypersensitive response.

Aim of the research is to investigate the influence of green fluorescent protein on the ability of harpins fused with GFP to induce hypersensitive response in plants.

The authors modified the genetic constructions based on vector pET42(a)+ and carrying genes *hpa1* and *xopF1* from strain *Xanthomonas campestris* 5.1 by inserting from either N' or C' terminus gene *sfGFP* derived by PCR with specific primers containing nucleotide fragments encoding restriction sites. The modified plasmids were cloned in cells of *Escherichia coli* XL1-Blue strain. Gene expression was carried out in cells of *E. coli* BL21(DE3) strain.

To date the following constructions were created: pEGsf (containing gene *sfGFP*), pEGh.3 (*sfGFP*, *hpa1*), pEhG14.1 (*hpa1*, *sfGFP*) and pExG13 (*xopF1*, *sfGFP*). We tested the expression level of each of them using western blot hybridization technique and fluorimetry. By the date the conference opens, we expect to engineer the vector with alternative positioning of genes *sfGFP* and *xopF1* and to conduct trials of chimeric proteins on tomato / tobacco cultivars.

Создание векторных конструкций, необходимых для получения химерных белков на основе зелёного флуоресцирующего белка (superfolder GFP) и харпинов

Чеботарёв Л.Ю., Валентович Л.Н.

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Аннотация. Объединение харпинов с зелёным флуоресцирующим белком направлено на увеличение растворимости и стабильности химерного белка, упрощение качественной и количественной оценки уровня экспрессии в рутинных экспериментах.

Ключевые слова: харпин, superfolder GFP, реакция гиперчувствительности, растительный иммунитет, гетерологичная экспрессия генов.

При гетерологичной экспрессии некоторых генов харпинов [1], сложно подобрать условия для получения достаточного количества белка в растворимой форме. Однако объединение харпинов с зелёным флуоресцирующим белком (superfolder GFP) [2] может решить как проблему растворимости и стабильности химерного белка, так и упростить качественную и количественную оценку уровня экспрессии в рутинных экспериментах. В работе [3] GFP, сшитый с HrpZ_{Pss}, не оказывал влияние на иммунный ответ томата. Тем не менее, недостаточно данных, чтобы оценить способность белка sfGFP влиять на проявление реакции гиперчувствительности растений в составе химерных белков.

Цель: изучить влияние зелёного флуоресцирующего белка на способность слитых с ним харпинов вызывать реакцию гиперчувствительности у растений.

Мы модифицировали полученные ранее на основе вектора pET42(a)+ экспрессионные конструкции, содержащие гены *hpa1* и *xopF1* штамма *Xanthomonas campestris* 5.1, путём включения в их состав либо с N- либо с C-конца гена *sfGFP*, полученного с помощью ПЦР со специфичными праймерами, содержащими нуклеотидные навески сайтов рестрикции. Клонирование плазмид выполняли в клетках штамма *Escherichia coli* XL1-Blue. Экспрессия проводилась в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3).

К моменту подачи тезисов получены конструкции pEGsf (содержит ген *sfGFP*), pEGh.3 (*sfGFP*, *hpa1*), pEhG14.1 (*hpa1*, *sfGFP*) и pExG13 (*xopF1*, *sfGFP*). Для каждой из них произведена оценка уровня экспрессии с помощью вестерн-блота, а также флуорометрии. К моменту конференции мы надеемся получить конструкцию с альтернативным расположением генов *sfGFP* и *xopF1*, а также провести испытание химерных белков на растениях томата и/или табака.

1. Harpins, multifunctional proteins secreted by gram-negative plant-pathogenic bacteria. / M. Choi [et al.] // Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI. – 2013. – Vol. 26 – P. 1115–22.
2. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein / J.-D. Pédelacq [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2006. – Vol. 24, № 1. – P. 79-88.
3. HarpinPss encapsulation in chitosan nanoparticles for improved bioavailability and disease resistance in tomato / S.R. Nadendla [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2018. – Vol. 199 – P. 11-19.