Національна академія наук України
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
(ІКБГІ НАН України)
03143, м. Київ-143, вул. Заболотного, 148;
тел.\ факс (044) 522 17 86

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор ІКБГІ НАН України,
академік НАН України

_____М.В. Кучук
(підпис)

"15" грудня 2021 р.

ЗАКЛЮЧНИЙ НАУКОВИЙ ЗВІТ ПРО РЕЗУЛЬТАТИ РЕАЛІЗАЦІЇ ПРОЄКТУ № 2020.01/0301

за договором № 27/01.2020 від 23 жовтня 2020 р
та за договором № 151/01/0301 від 7 травня 2021 р

«БІОСИНТЕЗ В РОСЛИНАХ РЕКОМБІНАНТНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ БІЛКІВ, ЯКІ ПРОТИДІЮТЬ ПОШИРЕННЮ ДЕЯКИХ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ВІРУСНОГО ТА БАКТЕРІАЛЬНОГО ПОХОДЖЕННЯ»

Науковий керівник НДР
г.н.с. відділу генетичної інженерії
академік НАН України, д.б.н., професор

_____М.В. Кучук
(підпис)

Рукопис закінчено «15» грудня 2021 р.
Результати цієї роботи розглянуто вченою радою ІКБГІ НАН України
«15» грудня 2021 р., протокол № 13

Київ – 2021

СПИСОК ВИКОНАВЦІВ

Керівник роботи директор ІКГБ НАНУ член-кор. НАНУ, д.б.н.	2021.12.15.	Кучук М.В. (реферат, вступ, висновки, розділ 2.1, 2.2)
Завідувач лабораторією адаптаційної біотехнології, д.б.н.	2021.12.15.	Матвєєва Н.А. (розділ 7)
Старший науковий співробітник відділу генетичної інженерії к.б.н.	2021.12.15.	Щербак Н.Л. (розділ 3.2, 4.2, 6)
Старший науковий співробітник відділу генетичної інженерії к.б.н.	2021.12.15.	Листван К.В. (розділ 3.4, 4.3, 4.2, 8)
Старший науковий співробітник відділу генетичної інженерії к.б.н.	2021.12.15.	Симоненко Ю.В. (розділ 1, 2.3)
Старший науковий співробітник відділу генетичної інженерії к.б.н.	2021.12.15.	Рудас В.А. (розділ 3.1, 5)
Науковий співробітник відділу генетичної інженерії к.б.н.	2021.12.15.	Овчаренко О.О. (розділ 3.3, 5)
Науковий співробітник відділу генетичної інженерії к.б.н.	2021.12.15.	Лучаківська Ю.С. (розділ 3.5., 7.2)
Провідний інженер відділу генетичної інженерії к.б.н.	2021.12.15.	Кирієнко А.В. (розділ 4.1., 4.2, 4.3)
Провідний інженер відділу генетичної інженерії к.б.н.	2021.12.15.	Ярошко О.М. (розділ 4.4, 4.5, 4.6)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР (заключний): 119 с., 57 рис., 11 табл., 72 джерела.

ІНТЕРФЕРОН АЛЬФА 2В, БАКТЕРІОЦИНИ, РЕКОМБІНАНТНІ БІЛКИ, ТРАНСГЕННІ РОСЛИНИ, ТРАНЗІЄНТНА ЕКСПРЕСІЯ

Об'єкт дослідження: біотехнологічні рослини, в яких в результаті генетичної трансформації або транзієнтної експресії відбувається експресія генів інтерферону альфа 2b та білків бактеріоцинів.

Мета роботи: отримати трансгенні рослини їстівних видів, які завдяки гетерологічній експресії генів інтерферону альфа 2b та білків бактеріоцинів проявляють антибактеріальну та антивірусну активність, а також оптимізувати технологію синтезу відповідних рекомбінантних білків в рослинах методом транзієнтної експресії.

Методи дослідження: методи молекулярного клонування; методи культури *in vitro,* генетичної трансформації рослин; методи транзієнтної експресії рекомбінантних білків; методи молекулярно-біологічного (ПЛР, ЗТ-ПЛР, метод вестерн-блоту), біохімічного та спектрофлуориметричного аналізу, метод білкової хроматографії (FPLC).

Результати та їх новизна:

Вперше були створені трансгенні рослини томату, в яких відбувається експресія антивірусного білку – інтерферону людини (HuIFNα-2b). Інтерферон людини HuIFNα-2b, синтезований в трансгенних рослинах томату, проявляв біологічну активність як *in vitro* в модельній системі (культура клітин мавпи, заражена вірусом), так і *in vivo* при зараженні живих мишей вірусом везикулярного стоматиту. В екстрактах листків трансгенних рослин томату сорту Шедевр біологічна активність була в сотні разів вищою, ніж для інших трансгенних рослин з геном інтерферону, і становила $850*10^3$ МО на 1 г сирої ваги.

При виконанні проекту вперше були створені їстівні трансгенні рослини, в яких підтверджено експресію антибактеріального білку-

бактеріоцину – коліцину М. Для отриманих трансгенних листових овочів (салат, мізуна, капуста кале) та коренеплодів (морква) була підтверджена антибактеріальна активність, що проявляється у припиненні росту різних штамів *Escherichia coli*. Накопичення рекомбінантного коліцину М в трансгенних рослинах салату становило біля 50 мкг на 1 мг сирої ваги, а антибактеріальна активність рослинних екстрактів становила в середньому $4*10^3$ УО.

Для однорічних видів з коротким вегетаційним періодом (салати, мізуна, томати) були отримані нащадки трансгенних рослин (F1), проведений аналіз та підтверджено успадкування трансгенів та трансгенних ознак у наступному поколінні рослин. Наявність рекомбінантного коліцину М в трансгенних рослинах була підтверджена методом вестерн-блот. Для обох фармацевтичних білків (інтерферону та коліцину М) було підтверджено збереження функціональної активності у висушеному рослинному матеріалі, що дає можливість використовувати порошок з висушених трансгенних рослин як готовий фармацевтичний препарат.

Були також досліджені трансгенні корені алтею, мангольду, пекінської капусти та цикорію з геном інтерферону альфа 2b. Показана здатність до накопичення ними інтерферону HuIFNα-2b, а також антивірусна активність екстрактів трансгенних коренів пекінської капусти та мангольду.

Рекомбінантний коліцин М в рослинах *Nicotiana benthamiana* також був отриманий за допомогою нового, розробленого при виконанні проекту, методу з використанням культури рослин *in vitro*, який базується на довготривалій транзієнтній експресії цільового гена, що відбувається завдяки системному поширенню генетичної конструкції.

РЕФЕРАТ /англійською мовою/

INTERFERONE ALPHA 2B, BACERIOCINS, RECOMBINANT PROTEINS, TRANSGENIC PLANTS, TRANSIENT EXPRESSION

Objects: the biotechnological plants where the genes of interferon alpha 2b and bacteriocin proteins are expressed *via* genetic transformation or transient expression.

Aim: to optimize the technology of the recombinant pharmaceutical proteins synthesis in plants by the method of transient expression and to carry out the molecular biological analysis of the transgenic plants and roots with the genes of colicin M and interferon alpha 2b.

Methods: *in vitro* culture methods, methods of plant infiltration with agrobacterial suspension and transient expression; methods of molecular biological (PCR, RT-PCR, Western blotting method), biochemical and spectrofluorimetric analysis, protein chromatography method (FPLC).

Results and their novelty: For the first time, the transgenic tomato plants able to express the antiviral protein of human interferon (HuIFNα-2b) were obtained. Human interferon HuIFNα-2b in the transgenic tomato plants demonstrated the biological activity both for the *in vitro* model system (the virus-infected monkey cell culture) and *in vivo* in case of infecting the mice with vesicular stomatitis virus. Here the biological activity was hundred times higher comparing to the other transgenic plants and came up to $850*10^3$ IU per 1 g FW in the transgenic tomato leaves.

In the course of the project, for the first time, we produced the edible transgenic plants characterized by confirmed expression of the antibacterial protein-bacteriocin - colicin M. The antibacterial activity (demonstrated *via* the termination of growth rate the various *Escherichia coli* strains) was proved for the transgenic leafy (salad, mizuna, kale) and taproot (carrot) plants. Accumulation of the recombinant colicin M in transgenic lettuce plants was

about 50 μg per 1 mg FW, and the antibacterial activity of the plant extracts averaged in 4 * 10^3 AU.

As the F1 generation of the transgenic annual plants of short term vegetation (lettuce, mizuna, tomatoes) was produced, the inheritance of the transgenes and the transgenic traits was confirmed. The presence of recombinant colicinin M in the transgenic plants was proved by Western blot analysis. The retention of the functional activity of both pharmaceutical proteins (interferon and colicin M) was confirmed for the dried plant material, which enables the usage of the dried transgenic plant powder as a pharmacy.

Transgenic roots of *Althaea officinalis*, mangold, Chinese cabbage and chicory with the interferon alpha 2b gene were studied in our work. The ability to accumulate interferon HuIFNα-2b, as well as antiviral activity of extracts of transgenic roots of Chinese cabbage and mangold are shown.

Recombinant colicin M was also produced in *Nicotiana benthamiana* plants *via* the new (as it was developed in the course of the project) method based on the long-term transient expression of the target gene in the *in vitro* plant culture due to the systemic spreading of the genetic construct.

ЗМІСТ

СПИСОК ВИКОНАВЦІВ……..…..… 2
РЕФЕРАТ…….....…….. 3
ЗМІСТ……. 7
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ……. 10
ОСНОВНА ЧАСТИНА…… 11
ВСТУП ……..... 11
РОЗДІЛ 1. Оптимізація та створення векторних конструкцій
для експресії рекомбінантних білків……... 15
1.1.Створення генетичної векторної конструкції з геном інтерферону альфа 2b людини для ефективної транзієнтної експресії в рослинах виду *Nicotiana benthamiana*..... ……... 16
1.2.Оптимізація генетичних векторів для стабільної генетичної трансформації рослин……..... 21
РОЗДІЛ 2. Транзієнтна експресія рекомбінантних білків ……..... 25
2.1. Транзієнтна експресія рекомбінантного репортерного білку GFP в культурі *in vitro* в рослинах *N. benthamiana*……..… 26
2.2. Транзієнтна експресія рекомбінантного коліцину М в рослинах *N. benthamiana,* що культивувались *in vitro* …… 28
2.3. Транзієнтна експресія рекомбінантних білків в листках *Nicotiana rustica*……... 31
РОЗДІЛ 3. Отримання трансгенних рослин з генами коліцину М та інтерферону альфа 2b людини……... 34
3.1. Генетична трансформація рослин томатів векторами, що містять ген інтерферону альфа 2b людини ……..……..... 35
3.2. Генетична трансформація рослин салату звичайного векторами, що містять ген коліцину М ……..… 37
3.3. Генетична трансформація листової капусти кале *Brassica*

oleraceae var. *sabellica* генетичною конструкцією,
що містить ген коліцину М……..... 39
3.4. Генетична трансформація рослин мізуни червоної
генетичною конструкцією, що містить ген коліцину М ……..... 41
3.5. Отримання трансгенних рослин броколі та моркви з геном
коліцину М…… .42
3.6. Отримання трансгенних рослин руколи *Eruca sativa* з геном
коліцину М…….. 45
РОЗДІЛ 4. Молекулярно-біологічний та генетичний аналіз
рослин, отриманих після експериментів з генетичної
трансформації ……..... .45
4.1. Молекулярно-біологічний аналіз рослин, отриманих після
генетичної трансформації вектором з геном коліцину М ……. 46
4.2. Аналіз успадкування трансгенів та трансгенних ознак у
наступному поколінні трансгенних рослин салату та мізуни 49
4.3. Підтвердження наявності рекомбінантного коліцину М в
трансгенних рослинах салату та мізуни методом вестерн-блот 51
4.4. Молекулярно-біологічний аналіз трансгенних рослин томатів,
що містять ген інтерферону людини альфа 2b..... 53
4.5. Успадкування гетерологічних генів *HuINFα-2b* та *nptII* у Т1
поколінні трансгенних томатів 54
4.6. Аналіз експресії генів *infα2b* та *nptII* в трансгенних томатах 56
РОЗДІЛ 5. Дослідження противірусної активності екстрактів трансгенних
томатів з геном *infα2b* ……... 58
5.1. Визначення біологічної активності інтерферону ……..... 58
5.2. Визначення активності інтерферону у трансгенних ліній
томатів сорту Шедевр 1 з геном …….....60
5.3. Збереження активності інтерферону людини в екстрактах з
трансгенних томатів при різних способах висушування …….. 64

5.4. Визначення продуктивних трансгенних ліній томатів та порівняння отриманих результатів з опублікованими даними …… 67
5.5. Визначення біологічної дії інтерферону, синтезованого в трансгенних томатах, на мишей лінії balb/c …….. 69
РОЗДІЛ 6. Аналіз антибактеріальної активності трансгенних рослин, що місять ген коліцину М……77
РОЗДІЛ 7. Отримання та дослідження трансгенних коренів з геном інтерферону *α2b* людини……..... 86
7.1. Отримання культутри трансгенних коренів пекінської капусти, що експресують ген інтерферону *α2b* людини……... 87
7.2. Отримання та аналіз культури трансгенних коренів та рослин мангольду, що експресують ген інтерферону *α2b* людини……... 90
7.2.1. Аналіз трансгенних рослин та трансгенних коренів мангольду..... 92
7.3. Дослідження рослин цикорію з геном інтерферону-α2b, регенерованих з «бородатих» коренів..... 96
7.3.1. Молекулярно-біологічний аналіз «бородатих» коренів цикорію та регенерованих пагонів..... 96
7.3.2. Визначення загального вмісту флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активності в трансгенних коренях цикорію..... 97
7.3. Дослідження трансгенних коренів алтею з геном інтерферону людини α2b……99
РОЗДІЛ 8. Стандартизація умов отримання білкових рослинних екстрактів з високим вмістом цільових рекомбінантних білків…….. 104
ВИСНОВКИ ……..……..…….. 109
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……..111

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАП	6-бензиламінопурин
ВМЦК	вірус мозаїки цвітної капусти Х вірусу картоплі
НОК	нафтилоцтова кислота
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
Т-ДНК	ділянка ДНК агробактерій, яка переноситься та вбудовується в рослинний геном при трансформації (від *англ.* Transferred DNA)
ТЕГ	транзієнтна експресія генів
ЦТАБ	цетрилтриетиламоній бромід
bar	ген фосфінотрицин ацетилтрансферази
*col*M	ген білку коліцину М
gfp	ген зеленого флуоресцентного білку
GFP	зелений флуоресцентний білок
infα2b	ген інтерферону альфа 2b людини
MS	середовище Мурашіге-Скуга
nos	ген нопалінсинтетази
nptII	ген неоміцинфосфотрансферази II
ocs	ген октопінсинтетази
RB, LB	правий та лівий повтори, які обмежують Т-ДНК
35S	послідовність ДНК, що кодує транскрипт 35S вірусу мозаїки цвітної капусти

ОСНОВНА ЧАСТИНА

ВСТУП

Для медичних препаратів білкової природи використовуються різні біологічні системи експресії, серед яких рослини вже зарекомендували себе як вигідна альтернатива бактеріям, дріжджам або клітинам ссавців [1, 2]. Рослини не містять патогенних для людини вірусів та пріонів, бактеріальних токсинів, не потребують застосування коштовного обладнання та культуральних середовищ. В більшості випадків в рослинній клітині відбуваються необхідні посттрансляційні модифікації та коректний фолдинг білків, необхідний для збереження їх функціональної активності. На відміну від інших систем експресії, рослини можуть бути використані не лише як біомаса для виділення цільового білка. За умови використання їстівних видів рослин та достатнього рівня накопичення фармацевтичного білка, такі рослини можуть бути використані в їжу як безпосередньо, так і у вигляді харчових добавок, створених на їх основі, в яких буде визначено активність медичного білка та обчислена рекомендована доза препарату. Такий підхід дозволяє оминути дороговартісний етап виділення та очищення цільового продукту.

Завданням нашого проєкту було отриманя трансгенних рослини, а також ліній трансгенних коренів, в яких проходить експресія противірусного білку інтерферону альфа 2b людини. Тип альфа 2b – це інтерферон лейкоцитарного типу, який широко використовують в медичній практиці як препарат з неспецифічною дією. В травні 2020 року була опублікована стаття, автори якої підтверджують ефективність інтерферону альфа 2b при лікуванні COVID-19 [3]. Препарати інтерферону сприяли швидшому виведенню вірусу з верхніх дихальних шляхів і зменшенню запальних процесів в організмі. В наших роботах раніше було показано, що інтерферон альфа 2b людини, синтезований в ІКБГІ НАН України транзієнтно в рослинах австралійського тютюну *Nicotiana*

benthamiana, спричиняв статистично достовірний інгібуючий ефект на клітинних лініях карциноми гортані [4].

Інший напрямок роботи по проєкту це синтез в рослинах бактеріоцинів – антибактеріальних білків, які здатні ефективно протидіяти розповсюдженню бактеріальних інфекцій [5-7]. Значна кількість інфекційних бактеріальних захворювань викликана споживанням продуктів харчування, які містять патогенні штами мікроорганізмів, такі як *Campylobacter spp, Escherichia coli, Salmonella spp*. Наприклад, у Сполучених Штатах кожного року фіксується близько 76 мільйонів випадків захворювань, 325 тисяч випадків госпіталізації та 5000 смертей, спричинених споживанням продуктів харчування, забруднених патогенними штамами мікроорганізмів. Серед них 265000 отруєнь та 30 летальних випадків, в яких збудниками є патогенні штами *E. coli* [8]. В даний час термічна інактивація є одним з найефективніших методів знищення хвороботворних бактерій у харчових продуктах, але можливості її використання досить обмежені, особливо якщо мова йде про зелені листові овочі та корм для тварин. Антибіотики дуже часто використовуються в профілактичних цілях для запобігання поширенню патогенних штамів бактерій у тваринництві. Але зловживання антибіотиками в тваринництві поглиблює одну з найнебезпечніших сучасних загроз – антибіотикорезистентність патогенних бактерій [9-12].

Ефективно протидіяти розповсюдженню бактеріальних інфекцій при забрудненні патогенними мікроорганізмами харчових продуктів можна за допомогою бактеріоцинів – невеликих білків, котрі продукуються бактеріями для знищення близькоспоріднених штамів при виникненні конкуренції за ресурси. Класифікація бактеріоцинів здійснюється відповідно до штамів-продуцентів: *Salmonella* (сальмоцини), *Klebsiella* (клебоцини), *Enterobacter cloaceae* (клоацини), *Escherichia coli* (коліцини) та зумовлює специфічність їх дії лише на певні штами

патогенних мікроорганізмів. Вже опубліковано результати досліджень, у яких доведено, що коліцини та сальмоцини можна синтезувати у рослинах, таких як *Nicotiana benthamiana*, за допомогою методу транзієнтної (тимчасової) експресії. Також була доведена можливість їхнього використання в якості харчових добавок [13-15]. Рослинні коліцини були визнані Управлінням з контролю за продуктами і ліками США (FDA) як GRAS (безпечні для споживання) та дозволені для застосування в якості антибактеріальних засобів. В нашій роботі ми демонструємо отримання коліцинів не тільки за рахунок транзієнтної (тимчасової) експресії відповідних генів, а в стабільно генетично трансформованих видах їстівних рослин – салаті, мізуні, моркві та ін. Навіть невелика кількість бактеріоцинів, що накопичується в трансгенних рослинах, при додаванні в їжу або корм для тварин, здатна запобігти розмноженню патогенних штамів мікроорганізмів і убезпечити від спалахів гострих бактеріальних інфекцій. Біотехнологічні рослини, в яких відбувається синтез таких білків, можуть бути використані для виділення відповідного очищеного білку, або використані безпосередньо як доповнення принаймні для корму тварин у сирому вигляді або у вигляді порошку з висушених (ліофілізованих) листків.

Перший етап роботи по проєкту за 2020 рік був присвячений отриманню та оптимізації векторів для синтезу рекомбінантних фармацевтичних білків інтерферону альфа 2b та коліцину М в рослинах, а також отриманню трансгенних рослин, в яких відбувається експресія цих фармацевтичних білків. Результати цього етапу роботи висвітлено у розділах звіту 1 та 3.

При виконанні першого етапу проекту у 2021 році була продовжена робота по регенерації та селекції трансгенних рослин, проведена оптимізація та реалізація методів транзієнтної експресії коліцину М в рослинах (Розділ 2). Також був проведений молекулярно-

біологічний аналіз отриманих трансгенних рослин та рослин, в яких проходить транзієнтна експресія рекомбінантного білку (Розділ 4).

Завдання заключного етапу проекту полягало у визначенні антивірусної та антибактеріальної активності екстрактів отриманих рослин; визначенні продуктивних трансгенних ліній та стандартизації умов отримання білкових рослинних екстрактів з високим вмістом цільового рекомбінантного білку (Розділи 5, 6, 7).

РОЗДІЛ 1. ОПТИМІЗАЦІЯ ТА СТВОРЕННЯ ВЕКТОРНИХ КОНСТРУКЦІЙ ДЛЯ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ.

Найпоширеніша проблема, з якою стикаються при експресії гетерологічних білків в рослинах – це низький рівень накопичення рекомбінантного білку. Перенаправлення (таргетинг) рекомбінантного білку у компартменти клітини (ендоплазматичний ретикулюм, апопласт, хлоропласти чи вакуолі), особливо у випадку його негативного впливу на функції клітини, може збільшити накопичення та стабільність білкового продукту в рослинах [16-20]. Для таргетингу в ендоплазматичний ретикулюм (компартмент, де відбувається N-глікозилювання, просторове складання та контроль якості білків) необхідна наявність N-кінцевого сигнального пептиду (SP), який відщеплюється після котрансляційного просування синтезованого білку в порожнину ендоплазматичного ретикулюму (ER). При відсутності інших SP синтезований білок по секреторному шляху потрапляє в апопласт, при наявності (SE)H/KDEL пептиду до С-кінця він утримується в ендоплазматичному ретикулюмі. Порівняльний аналіз показав, що рекомбінантні антитіла накопичуються більш ефективно, коли вони спрямовані в апопласт, ніж коли залишаються в цитоплазмі клітини [16].

Інший підхід, котрий може бути використаний для підвищення рівня накопичення рекомбінантного білку – використання методу транзієнтної (тимчасової) експресії генів, який дозволяє у найкращих випадках отримувати до 80 % рекомбінантного білка у екстракті загальних розчинних білків клітини [21]. Кінцевий вихід цільового білка залежить від різних факторів: вибору виду-продуценту [22, 23], фізичних параметрів та хімічних компонентів, конкретного цільового гена та білка, а також від самого експресійного вектору (промоторів, термінаторів, енхансерів, нетрансльованих регіонів тощо) [21, 24-26].

Складні експресійні вектори, що створюються на основі РНК-

вмісних рослинних вірусів, зазвичай демонструють значно вищі рівні накопичення цільового білка, ніж прості експресійні вектори, які містять лише класичний 35S промотор ДНК-вмісного вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК), цільовий ген та бактеріальний/вірусний термінатор. Такі складні експресійні вектори зазвичай базуються на основі тобамовірусів (вірусу тютюнової мозаїки, вірусу світлих жилок турнепсу) або потексвірусів (Х вірусу картоплі) [24, 25]. Важливим елементом складних експресійних систем є наявність вірусної РНК-залежної РНК-полімерази, яка забезпечує високу ефективність експресії цільового гена, також бажана наявність субгеномних вірусних промоторів, таких як промотори генів капсидних білків.

1.1. Створення генетичної векторної конструкції з геном інтерферону альфа 2b людини для ефективної транзієнтної експресії в рослинах виду *Nicotiana benthamiana*.

Вектор, що базується на Х вірусі картоплі, був використаний для клонування цільового гена інтерферону як акцепторний вектор; він був люб'язно наданий компанією Nomad Bioscience GmbH (м. Галле, ФРН). Схематичне зображення Т-ДНК вектору представлене на Рис. 1.1.

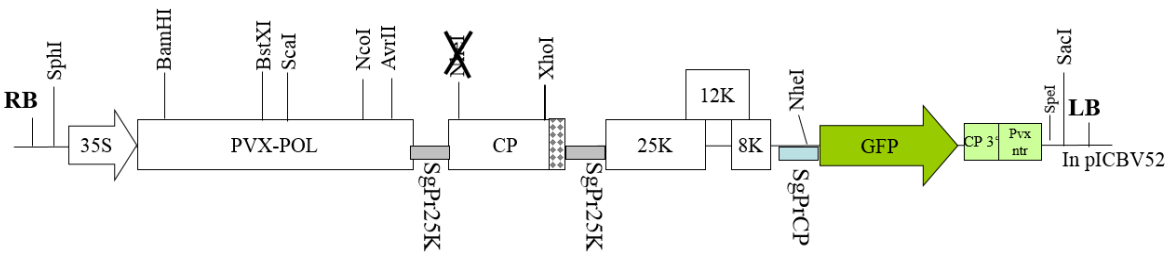


Рисунок 1.1. Схематичне зображення Т-ДНК рослинного експресійного вектору pICH27566 (А): 35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, PVX-Pol – ген, який кодує РНК-залежну-РНК-полімеразу Х-ВК, CP – ген,

який кодує капсидний білок X-ВК, 25K, 12K, 8K – гени, який кодують білки X-ВК, SgPr – субгеномні промотори X-ВК, ntr – ділянка, яка не транслюється, GFP – ген зеленого флуоресцентного білку.

Ключові елементи: ген, що кодує потексвірусну РНК-залежну РНК-полімеразу (PVX polymerase), під контролем 35S ВМЦК; гени, що кодують капсидний вірусний білок (PVX-CP), та потрійний блок генів (triple gene block 25K, 12K, 8K), під контролем субгеномного вірусного промотору гена *p25*; та цільовий ген (білка GFP) під контролем субгеномного вірусного промотору гена капсидного білка.

Для створення нової векторної конструкції ген, який кодує інтерферон людини альфа 2b, було вбудовано замість гену, який кодує маркерний білок GFP. Раніше в наших роботах було показано, що спрямування інтерферону в апопласт збільшує кінцевий вихід цільового продукту [27]. З цією метою було клоновано ген інтерферону, злитий у трансляційній рамці зчитування з кальретикуліновим апопластним сигналом таргетингу рослини виду *Nicotiana plumbagenifolia.* Схематичне зображення донорного вектору з геном інтерферону представлене на Рис. 1.2.

Рисунок 1.2. Схематичне зображення ділянки Т-ДНК вектору для генетичної трансформації з геном інтерферону: T*nos*– термінатор агробактеріальної нопалінсинтази; 35S – 35S промотор ВМЦК; *infα2b* – ген інтерферону альфа 2b людини, злитий з рослинним апопластним сигналом таргетингу (Cal), *bar* – ген фосфінотрицин ацетилтрансферази.

Оскільки донорний та акцепторний вектори не містять однакових сайтів рестрикції в потрібних ділянках ДНК, стратегія клонування шляхом простого вирізання фрагмента рестриктазами, та подальшого лігування

фрагмента та лінійного плазмідного вектора була неможливою. Для клонування цільового фрагмента була розроблена інша схема, описана нижче. Для отримання лінійного акцепторного вектору підбирались сайти рестрикції, які знаходяться поблизу існуючого цільового гена *gfp*. Найближчими виявились два сайти: унікальний сайт для гідролізу рестриктазою NheI та один із трьох сайтів для гідролізу рестриктазою HindIII. Для отримання акцепторного вектору з вирізаним цільовим геном *gfp* спершу замкнений у кільце вектор розщеплюють рестриктазою NheI. Таким чином утворюється лінійний вектор з липкими кінцями. Далі проводиться частковий гідроліз рестриктазою HindIII та, після розділення в 1 % агарозному гелі, відбирають найдовший фрагмент (довжиною 11311 п.н.). Далі бажаний фрагмент вирізають із гелю та виділяють ДНК на колонках за допомогою комерційного набору Nucleo Spin Extract II за прописом виробника. Слід відзначити, що ген інтерферону альфа 2b разом із апопластним сигналом таргетингу мають довжину 579 п.н., яка навіть менша за довжину існуючого цільового гена *gfp* (717 п.н.), отже, вставка не буде занадто великою, що забезпечить кращу стабільність експресійного вектору. Для отримання підготовленої для вбудовування вставки проводиться ампліфікація гена інтерферону з додаванням на кінцях необхідних сайтів рестрикції (для рестриктаз NheI та HindIII) методом ПЛР на матриці донорного вектору pCB125 із використанням високоточної ДНК полімерази (Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase). Продукти ампліфікації розділяють в 1 % агарозному гелі, вирізають із гелю та виділяють ДНК на колонках за допомогою комерційного набору Nucleo Spin Extract II за прописом виробника. Далі проводять гідролітичне розщеплення фрагменту рестриктазами NheI та HindIII для утворення липких кінців. Потім проводять лігування лінійного вектору та цільового фрагменту (ген інтерферону з кальретикуліновим сигналом). Отримана генетична векторна конструкція вводитиметься в клітини *Escherichia coli*

для перевірки правильності збирання генетичної конструкції та відсутності мутацій у цільовому гені. Надалі готова генетична векторна конструкція переноситиметься в клітини *Agrobacterium tumefaciens* для перевірки ефективності її роботи в рослинах, в першу чергу в рослинах роду *Nicotiana*.

Для виконання клонування гена інтерферону попередньо проводилась підготовча робота. Плазмідні вектори (акцепторний та донорний) виділяли із клітин *E.coli* (pCB125) з використанням комерційного набору для виділення плазмідної ДНК (Plasmid Miniprep Kit) за прописом виробника, або із клітин *A. tumefaciens* (pICH27566) за CTAB методом, та розділяли ДНК в 1 % агарозному гелі для підтвердження виділення плазмідної ДНК із бактеріальних клітин (Рис. 1.3.).

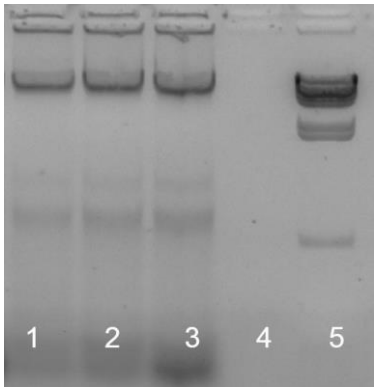


Рисунок 1.3. Електрофоретичне розділення ДНК в агарозному гелі після виділення плазмід: 1-3 ДНК, виділена із клітин *A. tumefaciens*, які містять плазмідний вектор pICH27566, 4 – негативний контроль, 5 – ДНК маркер

Отримані плазміди перевіряли на наявність цільового гена ПЛР методом з використанням ген-специфічних праймерів, наведених в таблиці 1.1. Амплікони розділяли в 1 % агарозному гелі та порівнювали реальну довжину фрагментів з очікуваною (Рис. 1.4. та Рис. 1.5.).

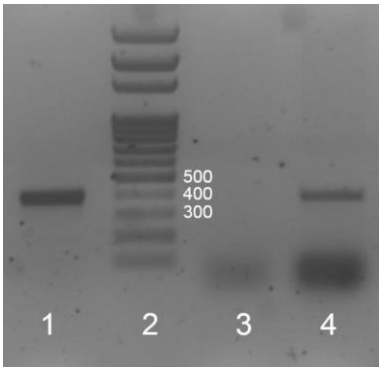


Рисунок 1.4. Електрофоретичне розділення ДНК в агарозному гелі після ПЛР ампліфікації з використанням інтерферон-специфічних праймерів: 1 – продукт ампліфікації на матриці плазмідного вектору pCB125, 2 – ДНК маркер, 3 – негативний контроль, 4 – позитивний контроль. Довжина очікуваного фрагмента – 396 п.н.

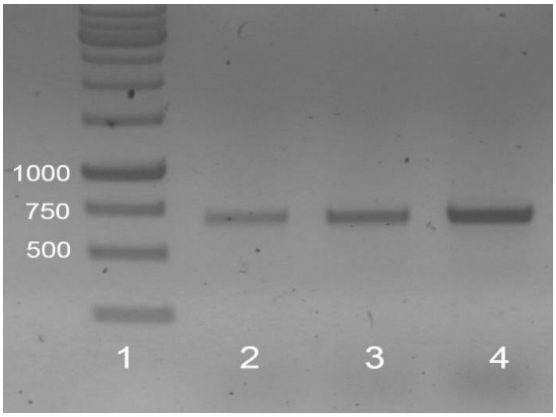


Рисунок 1.5. Електрофоретичне розділення ДНК в агарозному гелі після ПЛР ампліфікації з використанням *gfp*-специфічних праймерів: 1 – ДНК маркер, 2-4 – продукти ампліфікації на матриці плазмідного вектору pICH27566. Довжина очікуваного фрагмента – 703 п.н.

Наступний крок полягав в трансформації компетентних клітин *Escherichia coli* плазмідним вектором pICH27566 та виділенні достатньої для клонування кількості ДНК.

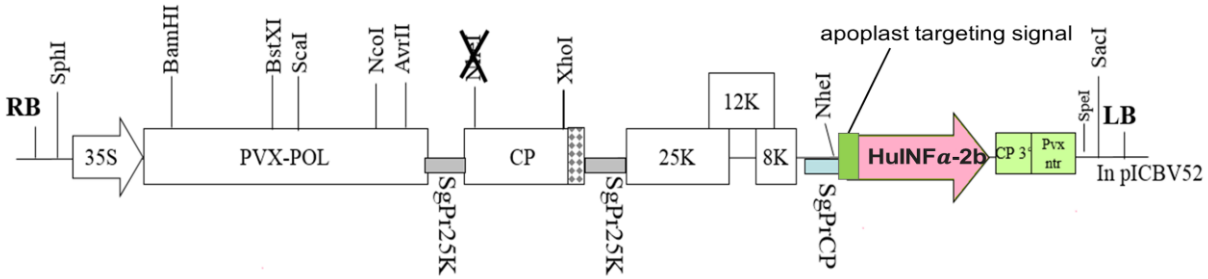


Рисунок 1.6. Схематичне зображення Т-ДНК новоствореного рослинного експресійного вектору (на основі вектору pICH27566), що містить ген людського інтерферону альфа 2b, який злитий у трансляційній рамці зчитування з апопластним сигналом таргетингу.

В результаті проведеної роботи була створена генетична векторна конструкція для ефективної транзієнтної експресії цільового трансгена в рослинах роду *Nicotiana*, яка основана на геномі Х вірусу картоплі та містить ген людського інтерферону альфа 2b, що злитий у трансляційній рамці зчитування з апопластним сигналом таргетингу (рис.1.6).

1.2. Оптимізація генетичних векторів для стабільної генетичноъ трансформації рослин.

Для реалізації першого етапу проекту по вдосконаленню вже наявних в ІКБГІ векторів ми використовували транскрипційні генетичні вектори, що містять послідовності рекомбінантних фармацевтичних білків з антибактеріальною та антивірусною активністю (білок-бактеріоцин коліцин М та інтерферон-α 2b). Використання цих векторів дозволяє отримувати фармацевтичні білки як методом транзієнтної (тимчасової) експресії, так і стабільної генетичної трансформації при створенні генетично модифікованих рослин, в котрих експресія відповідного гену відбувається постійно. В транскрипційних генетичних векторах цільові гени розташовані під контролем сильного конститутивного 35S промотору віруса мозаїки цвітної капусти.

Для роботи ми використовували метод клонування *Golden Gate* [28]. Golden Gate - це проста стратегія швидкого субклонування, яка використовується для перенесення будь-якого необхідного фрагмента ДНК з проміжного вектору в вектор експресії, не залишаючи послідовностей сайтів рекомбінації в ДНК. Це метод збирання фрагментів ДНК в транскрипційні одиниці, що базується на використанні ферментів рестрикції IIS типу та Т4 ДНК-лігази.

За основу при створенні векторів з геном інтерферону були взяті наявні в ІКБГІ НАН України вектори pCB124 та pCB125 Рис. 1.7 (А). У оптимізованих транскрипційних векторів перша транскрипційна одиниця містить функціональний ген стійкості до фосфінотрицину *bar* або канаміцину (*npt II*) для селекції рослин після генетичної трансформації, а друга транскрипційна одиниця - ген людського інтерферону α2b (INF α2b) під контролем 35S промотору вірусу ВМЦК. У оптимізованих векторів послідовність інтерферону містить додатково послідовність, що кодує 6 гістидінів (His tag) для аналізу білків методом Western Blot та їх швидкої очистки з використанням відповідних хроматографічних смол. Схеми оптимізованих транскрипційних генетичних конструкцій представлені на Рис. 1.7 (Б).

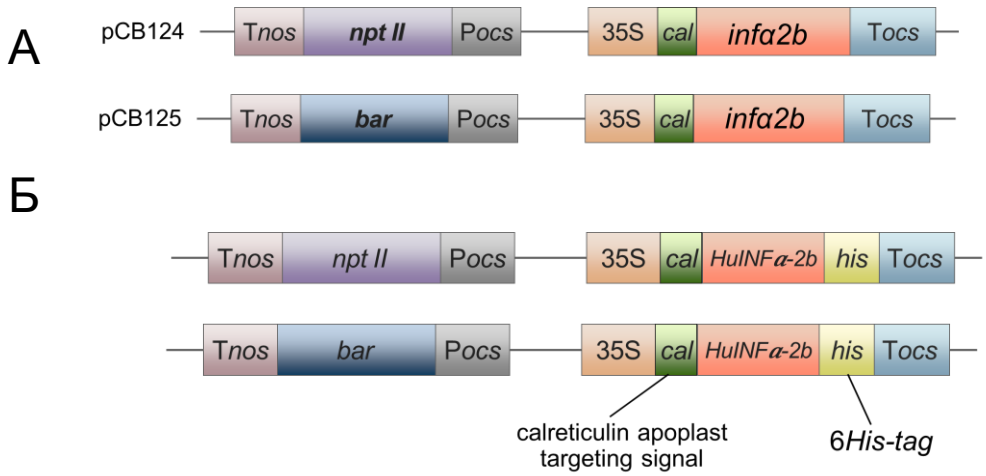


Рисунок 1.7. Схематичне зображення ділянки Т-ДНК векторів для генетичної трансформації з геном інтерферону: T*nos*– термінатор агробактеріальної нопалінсинтази; 35S – 35S промотор ВМЦК; *infα2b* – ген

інтерферону альфа 2b людини, злитий з рослинним апопластним сигналом таргетингу (Cal), *bar* – ген фосфінотрицин ацетилтрансферази; *nptII* - ген неоміцинфосфотрансферази II.

При створенні векторів з геном коліцину М за основу був взятий вектор pNMD46722, люб'язно наданий компанією Nomad Bioscience GmbH (м. Галле, ФРН). У цьому векторі послідовність гену коліцин М розміщена під контролем 35S промотору, а як селективний використано ген стійкості до фосфінотрицину *bar*, під контролем *nos* промотору. На основі цього вектору створено два похідні, представлені на рис. 1.8. Перший містить додатково сигнал апопластного таргетингу цільового білку, а другий - послідовність, що кодує 6 гістидинів (His tag), зшиту з послідовністю цільового білку (коліцину М) для аналізу білків методом Western Blot та їх швидкої очистки.

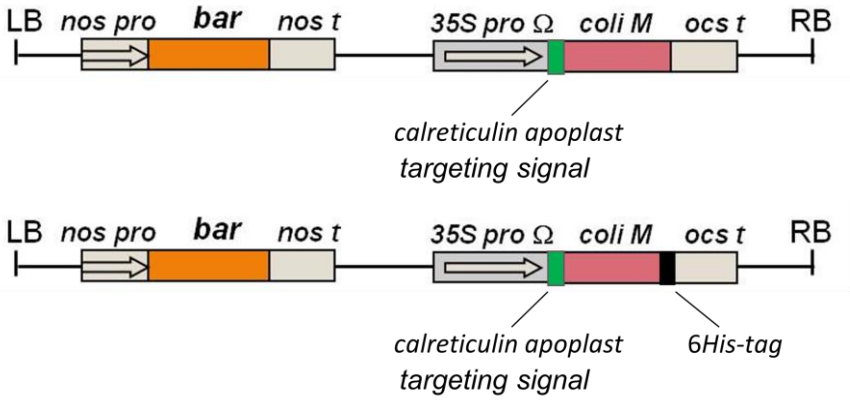


Рисунок 1.8. Схематичне зображення ділянки Т-ДНК векторів для генетичної трансформації з геном інтерферону: T*nos*– термінатор агробактеріальної нопалінсинтази; 35S – 35S промотор ВМЦК; *infα2b* – ген інтерферону альфа 2b людини, злитий з рослинним апопластним сигналом таргетингу (Cal), *bar* – ген фосфінотрицин ацетилтрансферази; *nptII* - ген неоміцинфосфотрансферази II.

В результаті проведеної роботи були отримані векторні генетичні

конструкції, що несуть гени коліцину М та інтерферону-α 2b, які були вдосконалені шляхом злиття послідовностей рекомбінантних цільових білків з послідовністю сигнальних пептидів (апопластного таргетингу) та з послідовностями 6xHis-tag для аналізу білків методом Western Blot та їх швидкої очистки.

РОЗДІЛ 2. ТРАНЗІЄНТНА ЕКСПРЕСІЯ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ.

Рекомбінантні білки у рослинах можна отримувати через стабільну або транзієнтну експресію трансгена. Транзієнтна експресія генів (ТЕГ) відбувається без інтеграції трансгена, і деякі біотехнологічні компанії (Medicago Inc., Icon Genetics GmbH, PlantForm) використовують *Agrobacterium*-опосередковану ТЕГ для отримання цільових рекомбінантних білків у рослинах виду *Nicotiana benthamiana*. ТЕГ дозволяє отримати вже через кілька днів високий вихід цільових білків (до 60-80% від загальної кількості розчинних білків клітини) [21, 29, 30], однак, синтез білків недовготривалий і зазвичай припиняється через 1-2 тижні. Недоліком даної системи є необхідний етап агроінфільтрації кожної окремої рослини. Такий процес вимагає наявності спеціального обладнання і використання дороговартісних складових для інфільтраційних буферів, що ускладнює виробничий процес. В даній роботі запропоновано новий ефективний метод для продукції рекомбінантних білків: транзієнтна експресія трансгена відбувається *in vitro* в культурі тканин рослин виду *Nicotiana benthamiana*. Такі рослини з цільовим геном можна розмножувати мікроклонально для отримання великої кількості нових рослин-продуцентів рекомбінантного білка. Зараження нових тканин та рослин відбувається завдяки системному поширенню генетичного вектора, створеного на основі геному фітопатогенного вірусу (Рис. 1.1.). Таким чином, повністю виключається етап агроінфільтрації нових рослин, оскільки інфікування іде природним шляхом. Транзієнтна експресія в культурі тканин *in vitro* носила довготривалий характер, і високі рівні цільового білка GFP виявляли протягом п’яти-шести місяців. Слід відмітити, що утримання рослин, які синтезують рекомбінантні білки, у контрольованих умовах *in vitro*, має

певні переваги, оскільки відповідає міжнародним вимогам GMP (належної виробничої практики) для фармацевтичних цілей.

2.1 Транзієнтна експресія рекомбінантного репортерного білку GFP в культурі *in vitro* в рослинах *N. benthamiana.*

Для отримання культури тканин рослини з транзієнтною експресією репортерного білка GFP на першому етапі проводили стандартну процедуру агроінфільтрації рослин виду *N. benthamiana* генетичною векторною конструкцією pNMD11740 (Рис. 1.1). Векторна конструкція, створена на основі геному фітопатогенного Х вірусу картоплі (Х-ВК), знаходилась в агробактеріальних клітинах. Після потрапляння Т-ДНК в рослинні клітини, вірусна полімераза утворювала РНК з цільовим геном, яка далі системно поширювалась по рослині, і потрапляла у верхні молоді листки (Рис. 2.1 А).

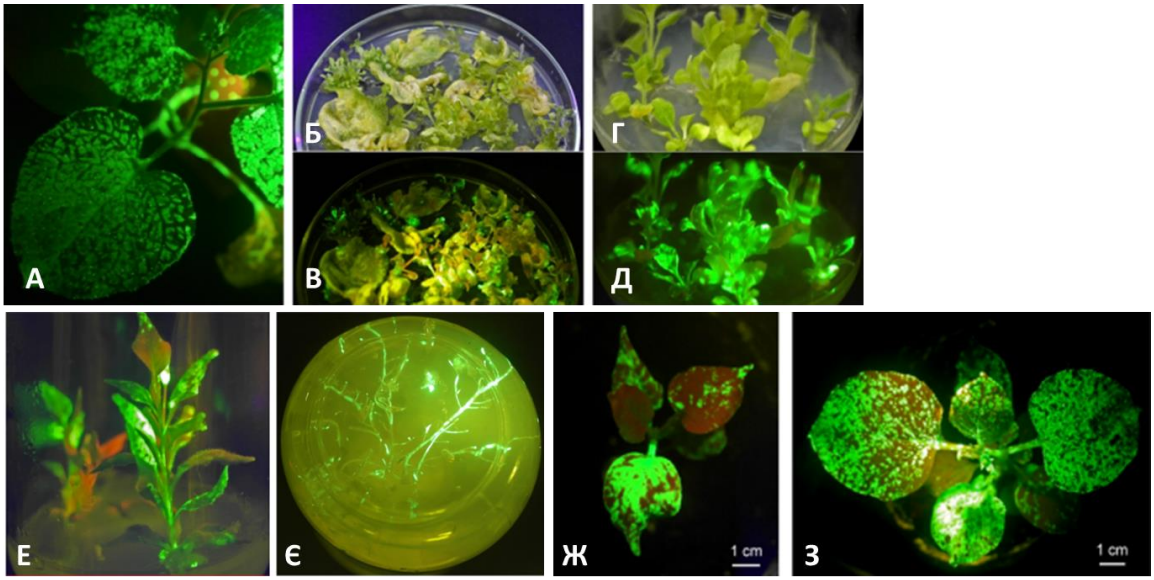


Рисунок 2.1. Отримання *in vitro* культури тканин, яка накопичує цільовий білок GFP внаслідок транзієнтної експресії генів. А – рослина *N. benthamiana* , в якій проходить транзієнтна експресія GFP в теплиці*; Б-Є* - *р*ослини-регенеранти з GFP на MS середовищі. Фотографії зроблені при

видимому (Б, Г) та УФ (В, Д, Е, Є) освітленні. Зелена флуоресценція (при УФ освітленні) вказує на накопичення GFP. Фотографії при УФ освітленні зроблені з використанням оранжевого фільтру.

Оскільки, вірусна РНК не вбудовувалась в геном рослини, то відбувалась ТЕГ. Верхні листки рослин з ознаками системної вірусної інфекції відбирали і переносили в стерильні умови *in vitro* на живильне середовище з фітогормонами для регенерації рослин з транзієнтною експресією гена GFP (Рис. 2.1 Б-Д). В рослинах регенерантах в культурі *in vitro* експресія рекомбінантного GFP відбувалась як у листках, так і у коренях (Рис. 2.1 Е-Є).

Рослини-регенеранти, що продовжували продукувати рекомбінантний білок, пересаджували в грунт. Перенесення в ґрунт індукувало ріст рослин і, відповідно, збільшувало загальний вихід цільового білка (Рис. 2.1 Ж, З). Середній вміст білка GFP становив 18 % від загальної кількості розчинних білків клітини (ЗРБ) (або 0,52 мг GFP/ г маси свіжого листя (СМ)). Найвище значення досягло 47 % ЗРБ (або 2 мг GFP/ г СМ). Загалом, у найкращому випадку було отримано біля 9 мг GFP з однієї рослин. Такі дані підтверджують гарний потенціал нової системи для отримання цільових білків у рослинах; після оптимізації умов система може бути застосована для широкомасштабного виробництва інших важливих рекомбінантних білків. Результати даного розділу представлені в публікації (Scopus, Q1): Sindarovska Y., Kuchuk M. (2021). Long-Term Potato Virus X (PVX)-Based Transient Expression of Recombinant GFP Protein in *Nicotiana benthamiana* Culture In Vitro. *Plants* 10(10): article 2187. https://doi.org/10.3390/plants10102187

2.2.Транзієнтна експресія рекомбінантного коліцину М в рослинах *N. benthamiana,* що культивувались *in vitro.*

У попередньому розділі була показана можливість накопичення високих рівнів репортерного білка GFP з використанням методу продукції рекомбінантних білків через культуру тканин рослин *in vitro*, який виключає етап агроінфільтрації, і полягає у довготривалій (кілька місяців) транзієнтній експресії цільового трансгена, яка відбувається завдяки системному поширенню вірусної РНК з цільовим геном. Надалі нами аналогічним чином була отримана культура тканин рослин *in vitro* з транзієнтною експресією фармацевтичного білка – коліцина М. Для експериментів використовували вектор pNMD11740 (рис.2.2), який був люб'язно надані компанією Nomad Bioscience GmbH (м. Галле, ФРН).

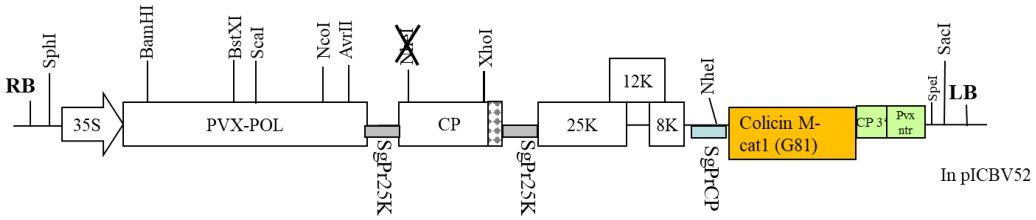


Рисунок 2.2. Схематичне зображення Т-ДНК рослинного експресійного вектору pNMD11740: 35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, PVX-Pol – ген, який кодує РНК-залежну-РНК-полімеразу Х-ВК, СР – ген, який кодує капсидний білок Х-ВК, 25К, 12К, 8К – гени, який кодують білки Х-ВК, SgPr – субгеномні промотори Х-ВК, colicin M – ген білка коліцина М.

Верхні листки рослин з ознаками системної вірусної інфекції відбирали і переносили в стерильні умови *in vitro* на живильне середовище з фітогормонами для регенерації рослин з транзієнтною експресією гена коліцина М (Рис. 2.3. А). Отримані регенеранти продукували фізіологічно-активний цільовий білок, активність якого була підтверджена через пригнічення росту клітин лабораторного штаму кишкової палички

(*Escherichia coli* XL1Blue) на агаризованому живильному середовищі (Рис. 2.3).

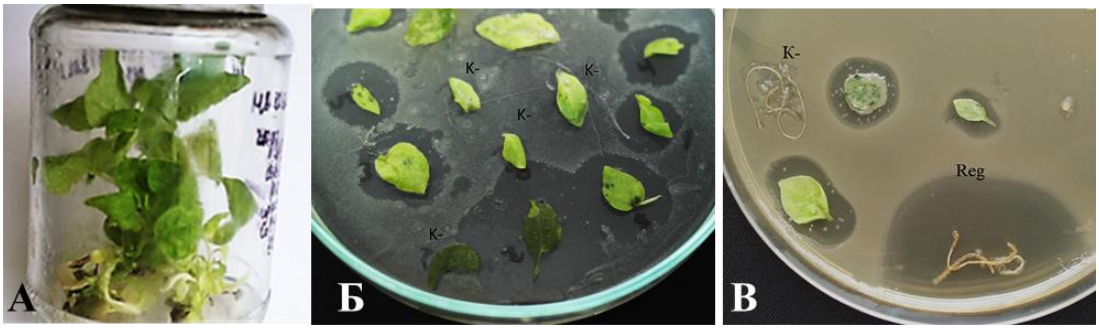


Рисунок 2.3. Регенеранти-продуценти білка коліцина М через транзієнтну експресію трансгена в умовах *in vitro*. А. Регенерант, що продукує коліцин, в умовах *in vitro*. Б, В. Тест на фізіологічну активність цільового білка коліцина, що накопичився в листках та коренях рослин-регенерантів: світлі ділянки навколо листків та коренів вказують на пригнічення росту патогенного штаму бактерій *E. coli*, К- – негативний контроль, Reg – корені регенеранта, який продукує коліцин.

Крім того, ми підтвердили, що цільовий білок коліцин М ефективно накопичується не лише в листях, але й в коренях рослин-регенерантів (Рис. 2.3. Б,В). Високий вміст цільового білка в коренях відкриває додаткові перспективи для розвитку даної технології. Рослини-продуценти коліцина можна підтримувати необмежено довго в культурі *in vitro* через мікроклональне розмноження або через повторну регенерацію рослин. Потрібно зазначити, що через культуру тканин ми отримали кілька десятків рослин-продуцентів цільового білка коліцина без використання додаткових агроінфільтраційних процедур.

Для отримання більшої біомаси та, відповідно, збільшення сумарного виходу цільового білка, рослини-регенеранти переносили у ґрунт та утримували протягом 1-1,5 місяців у тепличних умовах. За цей час рослини у 3-4 рази збільшувались у розмірах і мали виражені симптоми вірусної інфекції у вигляді дрібних некротичних або блідо-зелених ділянок

на листках (Рис. 2.4-А). Було доведено, що рослини, перенесені в ґрунт, також продукували фізіологічно-активний коліцин М. Сегменти листків регенерантів демонстрували пригнічення росту клітин патогенного штаму кишкової палички на твердому живильному середовищі (Рис. 2.5.-Б). Було помічено, що вміст цільового білка коліцина відрізняється у листках різного порядку, і найбільший вміст коліцина спостерігали у верхніх листках ($1^{й}$-$5^{й}$ листок від апексу). Такі ж результати раніше були показані для репортерного білка GFP. Такий результат є цілком очікуваним, оскільки саме у верхніх листках активно синтезуються рослинні білки.

Отже, для правильної оцінки сумарного вмісту коліцина у кожному окремому регенеранті, ми збирали усі листки з симптомами вірусного ураження і готували з них білкові екстракти. Електрофоретичне розділення сумарних білкових екстрактів чітко виявляло присутність нової смуги, яка відповідає молекулярній масі білка коліцина (Рис. 2.4-В).

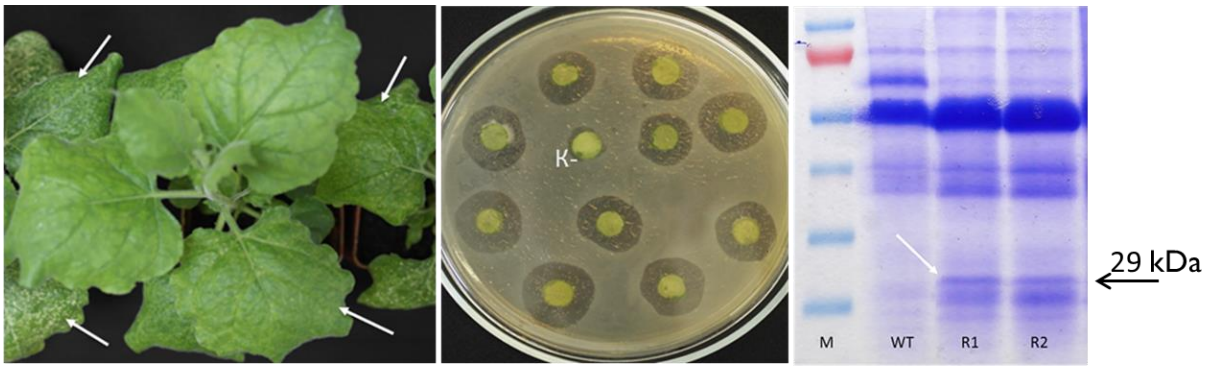


Рисунок 2.4. Аналіз рослин-продуцентів білку коліцину М через транзієнтну експресію трансгена в тепличних умовах.

А - регенеранти, перенесені з умов *in vitro* в ґрунт (стрілки вказують на ознаки вірусної інфекції).

Б - тест на фізіологічну активність цільового білка коліцина, що накопичувався в листках рослин-регенерантів: К- – негативний контроль.

В - електрофоретичне розділення білкових екстрактів з білком коліцином у поліакриламідному гелі у денатуруючих умовах: WT –

екстракт контрольної рослини (дикий тип), R1, R2 – екстракти із симптоматичних листків регенерантів, що несуть вірусний вектор з геном коліцина, М – білкові маркери молекулярної ваги.

Таким чином, ми підтвердили універсальність та ефективність розробленої методики для отримання високих рівнів рекомбінантних білків на прикладі рекомбінантного антимікробного білку коліцину М.

2.3. **Транзієнтна експресія рекомбінантних білків в листках *Nicotiana rustica***

Була проведена транзієнтна генетична трансформація рослин модельних видів роду *Nicotiana*, а саме махорки *N.rustica* та австралійського тьюнтіварі *N. benthamiana*, векторами, які містять гени рекомбінантних білків – ген бактеріоцина коліцину М, ген людського інтерферону альфа 2b та ген репортерного зеленого флуоресцентного білка *gfp* для візуалізації експресії перенесених рекомбінантних білків. Для реалізації цього етапу виконання проекту ми використовували транскрипційні генетичні вектори, що містять послідовності рекомбінантних фармацевтичних білків з антибактеріальною та антивірусною активністю (білок-бактеріоцин Коліцин М та Інтерферон-α 2b та репортерним білком GFP. Схеми генетичних векторів (транскрипційних та вірусних), що містять послідовності рекомбінантних білків, і які були використані для транзієнтної генетичної трансформація рослин представлені на Рис. 2.2., 2.5 та 2.6.

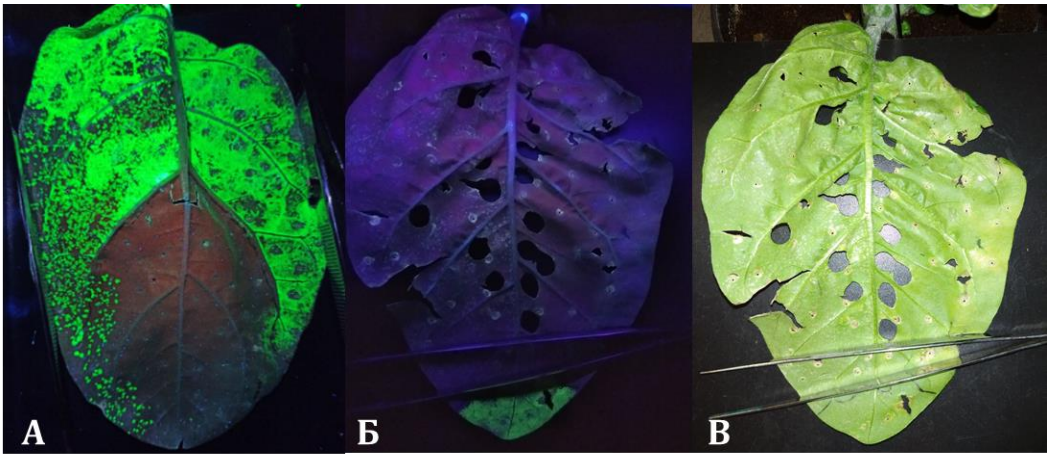


Рисунок 2.5. Транзієнтна експресія рекомбінантного GFP (А) та коліцину (Б, В) в листках *Nicotiana rustica.* Для порівняння ми використовували в роботі транскрипційний (ліва частина листка) та вірусний (права частина листка) вектори для кожного експерименту. Листові диски вирізали з інфільтрованих листків для детекції антибактеріальної активності.

В роботі ми використовували вектори з елементами вірусних геномів, такими як вірус тютюнової мозаїки (TMV) або вірус картоплі X (PVX), для ефективного отримання рекомбінантних білків [21, 29].

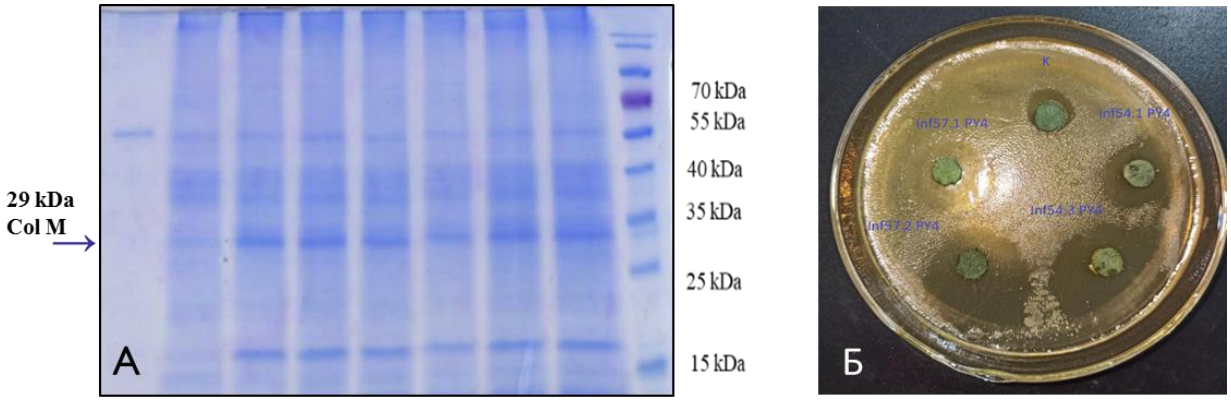


Рисунок 2.6. Аналіз транзієнтної експресії рекомбінантних білків в листках *Nicotiana rustica*: А - електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах (білкові екстракти тканини *N. rustica)*; Б - антибактеріальна активність листків махорки *N.rustica*, що експресують рекомбінантний коліцин М (проти *E.coli* штам

BL10-2).

Отже, рекомбінантний коліцин М в рослинах *Nicotiana benthamiana* був отриманий за допомогою розробленого при виконанні проекту нового методу з використанням культури рослин *in vitro*, який базується на довготривалій транзієнтній експресії цільового гена, що відбувається завдяки системному поширенню генетичної конструкції. При використанні іншого методу транзієнтної експресії був отриманий рекомбінантний коліцин М в рослинах *Nicotiana rustica*. Наявність рекомбінантного коліцину М в рослинних екстрактах підтверджена методом гель-електрофорезу білків в акриламідному гелі. Обидва підходи є ефективними для отримання фармацевтичних рекомбінантних білків в рослинах, та мають свої особливості: метод з використанням культури *in vitro* дозволяє витримувати стандартизовані умови синтезу та концентрованого накопичення рекомбінантних фармацевтичних білків, тоді як метод з використанням рослин *N. rustica* дозволяє отримувати велику кількість рослинної біомаси, що містить біофармацевтичну продукцію.

3. ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН З ГЕНАМИ КОЛІЦИНУ М ТА ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА 2В ЛЮДИНИ.

Генетична трансформація рослин дозволяє цілеспрямовано модифікувати геном з використанням генетичної інформації з різних гетерологічних систем: вірусів, бактерій, комах, тварин і людини. За допомогою генетичної інженерії стає можливим змінювати структуру генів, створювати нові, в тому числі і гібридні, гени. За допомогою методів генетичної інженерії стало можливим також створювати нові типи рослин, в тканинах яких синтезуються і накопичуються білки, що використовуються в медицині і фармакології. Цей напрямок біотехнології, що включає створення генетично модифікованих живих організмів із застосуванням методів генетичної інженерії для їх використання у виробництві фармакологічно активних субстанцій (наприклад, створення трансгенних рослин в якості продуцентів рекомбінантних білків для медицини та ветеринарії), називається біофармінг [31]. Рослинні платформи успішно застосовуються вже більше 20 років для ефективного виробництва фармакологічно цінних білків [32]. Переваги рослинних платформ над традиційними системами для виробництва рекомбінантних фармакологічних білків перераховані в огляді Ma et al, 2003 [33].

При розробці методик синтезу в рослинах білків фармацевтичного призначення важливо враховувати, що такий біотехнологічний продукт не повинен проходити процедуру термічної обробки, яка зруйнує третинну структуру, а, відповідно, і властивості рекомбінантного білку. З огляду на це, при виконанні першого етапу проекту був проведений відбір видів рослин, які надалі можуть бути використані в експериментах по генетичній трансформації векторами, що містять послідовності фармацевтичних білків. В роботу були включені листові (салат, мізуна, капуста), а також інші овочеві культури (томати, морква, капуста броколі), які можна надалі вживати в їжу без термічної обробки, або використовувати як добавку в

кормах для худоби. Для всіх цих овочевих культур була проведена робота по введенню в культуру *in vitro* та визначення ефективності регенерації різних видів експлантів. Генетичну трансформацію рослин проводили за допомогою агробактерій: нопалінового штаму *A. tumefaciens* GV3101; агропінового штаму *A. rhizogenes* A4.

Плазмідна ДНК бінарних векторів, застосованих в роботі, була перенесена до агробактеріальних штамів методом електропорації. Агробактерії, що несуть одну з зазначених бінарних конструкцій, вирощували в рідкому середовищі LB [34] або YTG pH 7,2-7,5 (табл. 3.1). з додаванням відповідних антибіотиків (50 мг/л карбеніциліну або 100 мг/л канаміцину, в залежності від вектору) на ротаційному шейкері (200 об./хв.) при температурі 28^0C протягом 48 годин.

Таблиця. 3.1

Склад живильних середовищ для вирощування бактеріальних культур, (г/л)

Компонент	Середовище	
	LB	YTG
Пептон	10	10
Дріжджовий екстракт	5	1
Глюкоза	-	10
NaCl	10	1
$MgSO_4$ x $7H_2O$	-	0,25
$CaCl_2$ x $2H_2O$	-	0,25

При вирощувані штамів *A. tumefaciens* в живильне середовище ще додавали ріфампіцин в концентрації 50 мг/л.

3.1. Генетична трансформація рослин томатів векторами, що містять ген інтерферону альфа 2b людини.

Як експланти для трансформації використовували гіпокотилі та сімядолі асептичних 10-денних проростків *Solanum lycopersicum*. Робили 3-

4 надрізи на сім'ядолях і гіпокотилях для підвищення ефективності трансформації. Переносили гіпокотилі та сім'ядолі на середовище для індукції калюсу томатів (СІМ – середовище МС [35] з 0,2 мг/л кінетину і 1 мг/л 2,4D) і залишали на 1 день при розсіяному освітленні за температури 22˚- 24 ˚ С.

Культивування агробактерії проводили на середовищі LB на ротаційному шейкері за температури 28˚С. Наступного дня бактерію центрифугували при 3000 g 8-10 хв, осад ресуспендували у розчині 10 мМ $MgSO_4$. Сім'ядолі та гіпокотилі обробляли суспензією бактерій протягом 10 хвилин, просушували на фільтрувальному папері, переносили на середовище СІМ, доповнене ацетосирінгоном у концентрації 200 мкМ. Чашки залишали в культуральній кімнаті на розсіяному світлі за температури 22˚-25С на 2 дні.

Через два дні перенесли трансформовані сім'ядолі та гіпокотилі на середовище для індукції пагонів (SIM I – МС [35] доповнене 2 мг/л зеатину та антибіотиками: цефотаксимом (500 мг/л) та канаміцин сульфатом (100 мг/л). Кожні 14-18 днів сім'ядолі та гіпокотилі пересаджували на нове середовище (SIM II- МС доповнене 1 мг/ л зеатину і 0, 5 мг/л гіберелової кислоти та цефотаксимом (300 мг/л), канаміцин сульфатом (100 мг/л) до тих пір, поки не утворяться зелені пагони.

В експерименті по генетичній трансформації томата конструкцією рСВ124 (рис. 1.7.) використовували по 100 сім'ядолей сортів Шедевр 1 і Ляна. Через 2 тижні після експерименту з генетичної трансформації спостерігали утворення перших стійких до канаміцину трансгенних калюсів (Рис.3.1). Через 40-45 днів спостерігали ріст канаміцинстійких (ймовірно, трансгенних) калюсів, в той час як в негативному контролі (сім'ядолі на середовищі з канаміцином) утворення калюсів не відбувалося. Канаміцинстійкі калюси відділяли від мертвих тканин і переносили на свіже регенераційне середовище, де відбувалась регенерація

пагонів. (Рис. 3.1.).

Пагони довжиною 1-1,5 см відрізали і переносили на середовище для індукції коренів томатів (1/2 МС, 0,1 мг/л NAA, цефотаксим 300 мг/л, канаміцин сульфат 50 мг/л). Пагони утворювали корені через 8-12 днів. Рослини розмножували живцюванням, а потім висаджували в грунт.

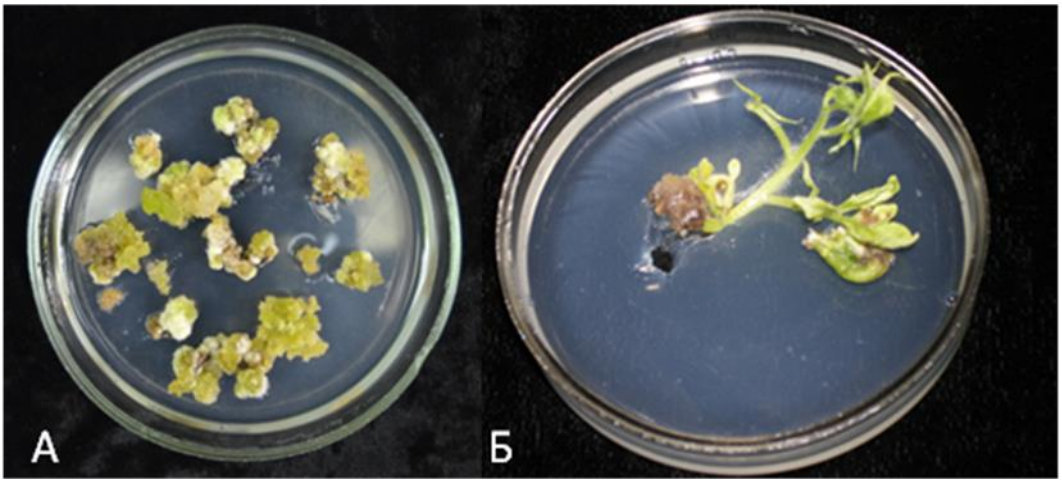


Рисунок 3**.1.** Утворення трансгенних калюсів після трансформації сім'ядолей *S. lycopersicum* на середовищі з канаміцином (А); регенерація трансгенного клону сорту Шедевр 1.

ПЛР аналіз двох рослин сорту Шедевр 1 і двох рослин сорту Ляна підтвердив інтеграцію генів *npt* II і a2b інтерферону людини в геном всіх проаналізованих рослин. Результати молекулярно-біологічного аналізу представлені в розділі 4.

В результаті проведених експериментів по генетичній трансформації томату векторами, що містять ген інтерферону альфа 2b людини, отримано 3 трансгенні рослини сорту Шедевр 1 та 2 рослини сорту Ляна.

3.2. **Генетична трансформація рослин салату звичайного векторами, що містять ген коліцину М.**

Для оптимізації методики трансформації салату *Lactuca sativa* використовували різні схеми селекції, які відрізнялися за часом додавання до середовища цефотаксиму, який пригнічує ріст агробактерій (через 1-3 дні), а також часом додавання селективного агенту фосфінотрицину (1-7днів).

Експланти з попередньо зробленими насічками інкубували у бактеріальній суспензії протягом 30 хв, далі культивували в чашках Петрі на агаризованому середовищі MS з 1 г/л морфоліноетансульфонової кислоти, 2,5 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК протягом 1-3 діб. Цефотаксим додавали до середовища через 1-3 доби. Фосфінотрицин у концентрації 4 або 5 мг/л додавали через 1-7 діб після трансформації агробактеріями. Визначали ефективність методики, оцінюючи частоту регенерації зелених пагонів, здатних нормально розвиватися на живильному середовищі з канаміцином. Частоту регенерації пагонів визначали як відношення кількості експлантів із зеленими у селективних умовах регенерованими пагонами до загальної кількості експлантів, виражене у відсотках. За оптимальний вважали такий протокол, за використання якого частота утворення зелених пагонів була найвищою.

Проведеними дослідженнями встановлено, що найменший термін культивування без цефотаксиму та фосфінотрицину (додавання антибіотиків через одну добу після трансформації) не дозволяє отримати трансформовані рослини. За таких умов зазвичай усі 100% експлантів гинули впродовж 7-10 діб. Підвищення часу вирощування без цефотаксиму до трьох діб сприяло формуванню пагонів, зокрема, частота формування зелених рослин становила 55-61%. Разом з тим встановлено, що найбільша кількість зелених у селективних умовах рослин була при додаванні цефотаксиму через три доби, а фосфінотрицину у концентрації 4 мг/л - ще через одну добу. При такому протоколі культивування частота формування зелених пагонів становила до 89%. Саме цей варіант може

бути використаний для отримання трансгенних рослин салату з високою частотою.

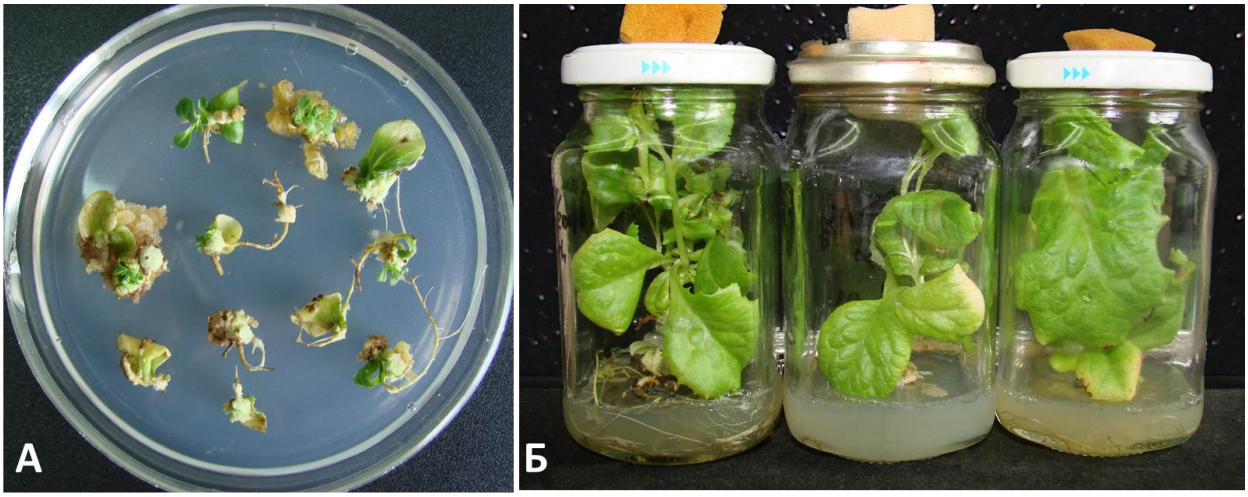


Рисунок 3.2. Регенерація зелених пагонів (А) та вкорінені рослини-регенеранти салату (Б) після трансформації вектором з геном коліцину М при застосування оптимізованого протоколу.

Оптимізований протокол було використано для отримання зелених рослин салату з геном коліцину М (рис.3.2.). Зелені рослини-регенеранти вкорінювали на середовищі МС [35], доповненому 0,5 мг/л ІМК. Для підтвердження наявності перенесених генів у рослин, отриманих за умови додавання до живильного середовища фосфінотрицину у концентрації 4 мг/л, використовували метод ПЛР.

3.3. **Генетична трансформація листової капусти кале *Brassica oleraceae* var. *sabellica* генетичною конструкцією, що містить ген коліцину М**

Було досліджено регенераційну здатність гіпокотилів та сім'ядоль 4-х різних сортів *Brassica oleracea* var. *sabellica*. Виявлено високий рівень ендогенної інфекції в сорту Пурпурна, що робить її непридатною для подальших експериментів. Частота регенерації зелених ембріогенних калюсів становила 50% для сортів капусти Грюнколь та Чарівниця,

натомість ще для одного для сорту цей показник становив 0%. Тому для подальших експериментів з генетичної трансформації вирішено використовувати сорти Грюнколь і Чарівниця.

Було протестовано вихідні сорти капусти на наявність спонтанної стійкості до селективного агента фосфінотрицину. При використанні фосфінотрицину в концентрації 2 мг/л здатність до регенерації зелених тканин сортів Грюнколь та Чарівниця пригнічувалася, а при 5 мг/л вона була повністю відсутня. Отже для подальших експериментів вирішено використовувати ступінчасту селекцію з селективними концентраціями 2 мг/л на першому етапі та 5 мг/л на другому.

В якості експлантів для генетичної трансформації використовували гіпокотилі та корені асептичних проростків. Гіпокотилі нарізали шматочками довжиною 5-7 мм, корені обережно виймали з субстрату, щоб не пошкодити. Нарізані експланти переносили на живильне середовище МС [35] з 1 мг/л 2,4-Д для індукції калюсу. На другу добу експланти інокулювали суспензією агробактеріальних клітин в 0,01 М розчині сульфату магнію. Для приготування суспензії свіжу культуру агробактерії осаджували при 4000 g протягом 10 хв, осад ресуспендували чотирикратним об'ємом 0,01 М розчину сульфату магнію. Інокуляцію проводили в чашці Петрі без середовища протягом 10 хв. Після того, експланти переносили на 3 доби для співкультивації на живильне середовище.

Для елімінації агробактерії експланти культивували на середовищі для регенерації, яке містило базовий склад середовища МС з додаванням 5 мг/л тіосульфату срібла, 1 мг/л зеатину, 4 мг/л БАП, 600 мг/л цефотаксиму та 2 мг/л фосфінотрицину. На наступний пасаж експланти переносили на середовище МС з додаванням 5 мг/л тіосульфату срібла, 4 мг/л БАП, 600 мг/л цефотаксиму та 5 мг/л фосфінотрицину (Рис.3.5.). Пасажі проводили кожні два тижні.

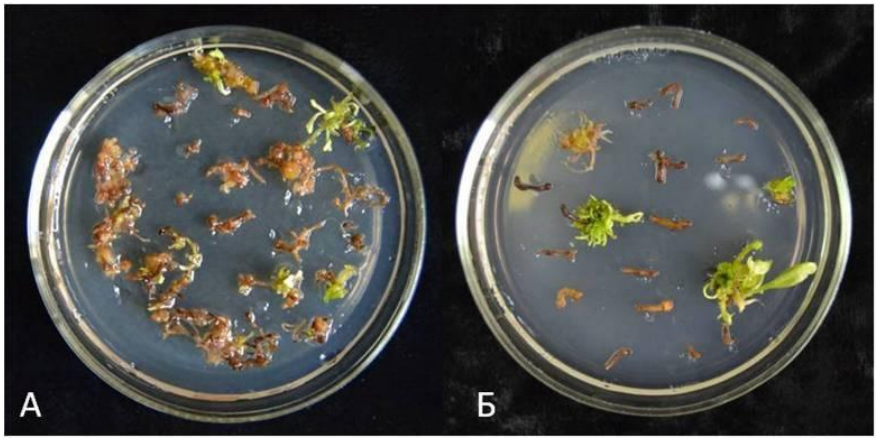


Рисунок 3.3. Регенерація стійких пагонів капусти кале з гіпокотилів (А) та коренів (Б) на регенераційному середовищі з 5 мг/л фосфінотрицину.

Отже, було відібрано сорти капусти кале *Brassica oleraceae* var. *sabellica* з високою регенераційною здатністю, проведено генетичну трансформацію цього виду конструкцією з геном коліцину та отримані трансгенні рослини цього виду.

3.4. **Генетична трансформація рослин мізуни червоної генетичною конструкцією, що містить ген коліцину М.**

Мізуна червона (японська капуста, японська гірчиця) *Brassica rapa* subsp. *nipposinica* var. *laciniata* (Brassicaceae) (Рис. 3.4-А) є салатною культурою, що набуває популярності на ринку зеленних овочевих культур. Було проведено генетичну трансформацію експлантів японської капусти шляхом співкультивування з суспензією агробактерій, що несуть плазміду з геном антибактеріального білка коліцину.

Для генетичної трансформації як експланти використовували гіпокотилі 5-7 денних асептичних проростків. Після співкультивування з суспензією агробактерій експланти протягом тижня культивували на середовищі, що містило фітогормони 2,4-Д (2 мг/л) та БАП (0,5 мг/л). Подальша регенерація пагонів (Рис. 3.4-Б) відбувалась на поживному

середовищі МС [35], що містило зеатин (2 мг/л), БАП (1 мг/л) та НОК (0,5 мг/л); для селекції потенційних трансформантів використовували фосфінотрицин у концентраціях 5 та 10 мг/л. Рослини-регенеранти з'являлись після 3-4 тижнів культивування; було нарощено їх біомасу (Рис. 3.4.-В) для подальших молекулярно-біологічних досліджень.

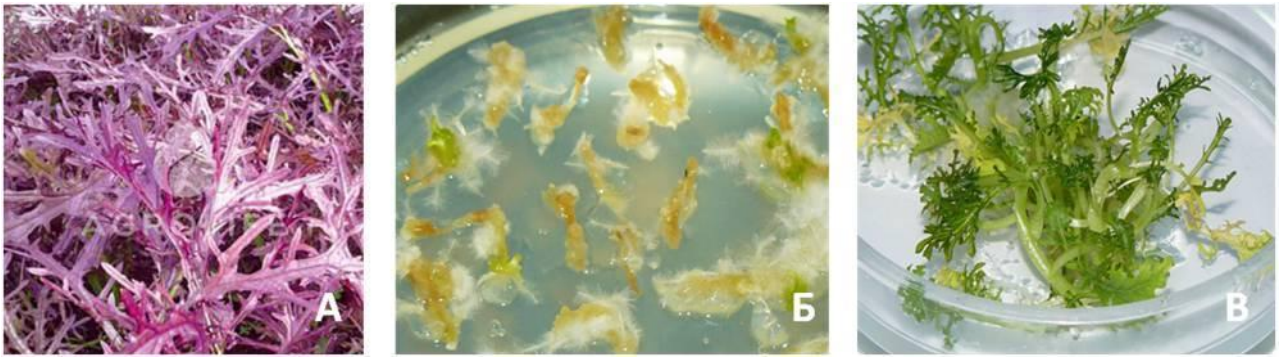


Рисунок 3.4. Мізуна червона *Brassica rapa* subsp. *nipposinica* var. *laciniata*: А – загальний вигляд; Б – початкові етапи регенерації рослин з гіпокотильних експлантів; В – сформовані рослини-регенеранти.

Проведений молекулярно-біологічний аналіз підтвердив наявність селективного гену коліцину у трьох відібраних трансгенних лініях мізуни. Результати молекулярно-біологічного аналізу трансгенних рослин представлено у розділі 4.

3.5. **Отримання трансгенних рослин броколі та моркви з геном коліцину М.**

Були проведені експерименти з генетичної трансформації рослин капусти броколі *Brassica oleracea* сортів: Батавія, Вітамінна, Тонус, Романеска. Для проведення експериментів були використані методики генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* та методики регенерації рослин капусти броколі при використанні сім'ядольних експлантів та гіпокотилів 10-денних проростків. Всього для

трансформації було використано 59 експлантів капусти броколі сорту Батавія, 34 експланта капусти броколі сорту Вітамінна, 93 експланти капусти броколі сорту Тонус, 71 експлант капусти броколі сорту Романеска.

Перед трансформацією проводилось кількаденне культивування експлантів капусти броколі на середовищі, що містить 2 мг/л бензиламінопурину. Надалі проводилось співкультивування експлантів з *Agrobacterium tumefaciens,* що містить вектор з геном коліцину. Для проведення регенерації було використано середовища на основі середовища Мурашіге –Скуга [35] з додаванням 1) 2 мг/л бензиламінопурину та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти; 2) 5 мг/л бензиламінопурину, 2 мг/л індолілоцтової кислоти. Проводилась пересадка всіх експлантів після трансформації спочатку на середовище, до якого крім фітогормонів було додано також і цефотаксим. Через 2 тижні всі експланти пересаджували на середовище, яке містило гербіцид фосфінотрицин у концентрації 5 мг/л для селекції трансгенних рослин (Рис. 4.5).

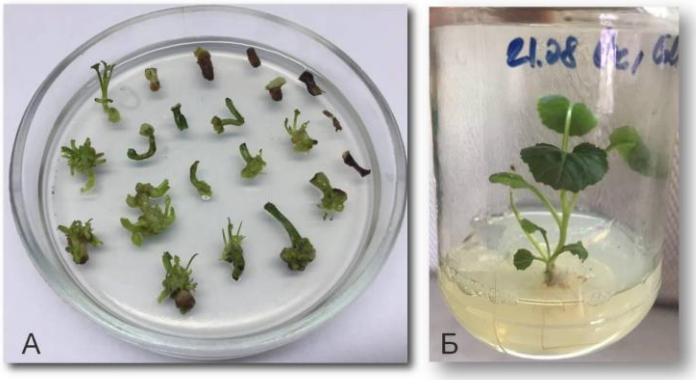


Рисунок 4.5. Перший етап регенерації трансформованих вектором з коліцином рослин броколі на селективному середовищі (А) та укорінення рослин броколі на середовищі з 0,1 мг/л НОК (Б).

Для трансформації моркви були використані гіпокотилі асептичних проростків моркви.

Регенерацію рослин проводили на середовищі МС, доповненому 1

мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК, яке також містило 5 мг/л фосфінотрицину для селекції трансгенних рослин.

Рисунок 4.6. Індукція калюсу та регенерація рослин з гіпокотилів моркви після генетичної трансформації:
А , Б – формування калюсу після чотирьох (А) та десяти (Б) тижнів культивування;
В – регенерація рослин (через 16 тижнів);
Г – рослини регенеранти на середовищі для вкорінення.

Було відібрано 23 рослин моркви та 32 рослин капусти броколі, що були отримані на селективному середовищі після трансформації векторами, що містять ген коліцину.

Отже, в результаті проведених експериментів по генетичній трансформації рослин векторами, що містять ген коліцину М, було отримано трансгенні рослини капусти броколі, капусти кале, моркви, салату та мізуни. Наявність генів *bar* та *colM* у геномі отриманих рослин підтвердили за допомогою ПЛР аналізу та гель-електрофорезу, а також за допомогою метода ЗТ-ПЛР підтвердили експресію трансгенів в рослинах моркви, мізуни та салату (див Розділ 4). В наступних дослідженнях також було підтверджено наявність антибакеріальної активності в екстрактах та експлантах отриманих трансгенних рослин (див. Розділ 5).

За цими результатами подано заявку на патент на корисну модель: номер заявки u202107155, Кучук М.В., Щербак Н.Л., Листван К.В., Прохорова Є.М. «Спосіб отримання трансгенних рослин салату, мізуни та моркви, що мають антибактеріальну активність проти патогенних штамів

Escherichia coli».

3.6. **Отримання трансгенних рослин руколи *Eruca sativa* з геном коліцину М.**

В якості експлантів використовували сегменти гіпокотилів асептичних проростків руколи *Eruca sativa* сорту Колтівата. Після агробактеріальної трансформації експланти культивували на регенераційному середовищі, котре містило регулятори росту БАП (2 мг/л) та НОК (0,1 мг/л) на 2 перших пасажах, тідіазурон (0,5 мг/л) та НОК (0, 5 мг/л) – на 3-4-му та зеатин (2 мг/л), БАП (1 мг/л) та НОК (0,5 мг/л) – на наступних пасажах. Після 4 місяців культивування було відібрано п’ять клонів, стійких до селективного агента фосфінотрицину; для всіх з них методом ПЛР було підтверджено наявність гену коліцину М.

РОЗДІЛ 4. МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИЙ ТА ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОСЛИН, ОТРИМАНИХ ПІСЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТІВ З ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ.

Для доведення інтеграції трансгенів в геном рослин, які отримано в результаті генетичної трансформації, проводили ПЛР-аналіз сумарної рослинної ДНК, виділеної СТАБ методом [17] з додатковим очищенням водного розчину ДНК сумішшю хлороформ : ізоаміловий спирт (24 : 1). До водного розчину сумарної ДНК додавали рівний об'єм 2 М NaCl та проводили інкубацію при 56^0С протягом години. Після чого додавали 0,1 об'єм розчину 10% цетрилтриетиламоній броміду із 0,7 М NaCl та проводили депротеїнізацію сумішшю хлороформ : ізоаміловий спирт (24 : 1). ДНК із водної фази переосаджували двома об'ємами 96% етилового спирту та розчиняли деіонізованою водою.

Послідовності праймерів та відмінності в умовах ампліфікації (температура відпалу праймерів) для трансгенів наведено в таблиці 1.1.

Розділення продуктів ампліфікації проводили за допомогою горизонтального електрофорезу в 1% агарозному гелі, що містив та 5 мкг/мл броміду етидію.

Таблиця 4.1. Послідовності та умови ампліфікації ген-специфічних праймерів, які були використані в роботі

Ген	**Послідовність праймерів**	**Очікуваний розмір амплікона, п.н.**	**Температура відпалу**
infα2b-1	5’-TTC TGC TCT GAC AAC CTC-3’ 5’-TTG ATG CTC CTG GCA CAG-3’	396	60˚C
infα2b-2	5’-CTCCTGCTTGAAGGACAG-3’, 5’-GGAGTCCTCCTTCATCAG-3’	264	60˚C
gfp	5’-ATGGTGAGCAAGGGCGAG-3’ 5'-CCATGCCGTGAGTGATCC-3'	703	57 ˚C
nptII	5’GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG–3’ 5’-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3’	700	60˚C
virC	5’-ATC ATT TGT AGC GAC T-3’ 5’-AGC TCA AAC CTG CTT C-3’	720	55˚C
rolB	5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA-3' 5'-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC-3'	780	65˚C
bar	5'-ACATCGAGACAAGCACGGTC-3' 5'-GCCAGAAACCCACGTCATGC-3'	463	59˚C
col M	5'-ATGGAAACCCTTACTGTGCACGCTC-3' 5'-CCTCTTACCAGACTCTTTGATGTG-3'	986	56˚C

4.1. Молекулярно-біологічний аналіз рослин, отриманих після генетичної трансформації вектором з геном коліцину М.

В результаті проведених експериментів з генетичної трансформації рослин вектором, що містить послідовність гену коліцину М, були отримані трансгенні рослини різних видів: рослини тютюну (модельний

об'єкт), капусти броколі, капусти кале, салату звичайного, мізуни, руколи та моркви. Трансгенні рослини були відібрані на селективному середовищі, яке містило 4 або 5 мг/л фосфінотрицину.

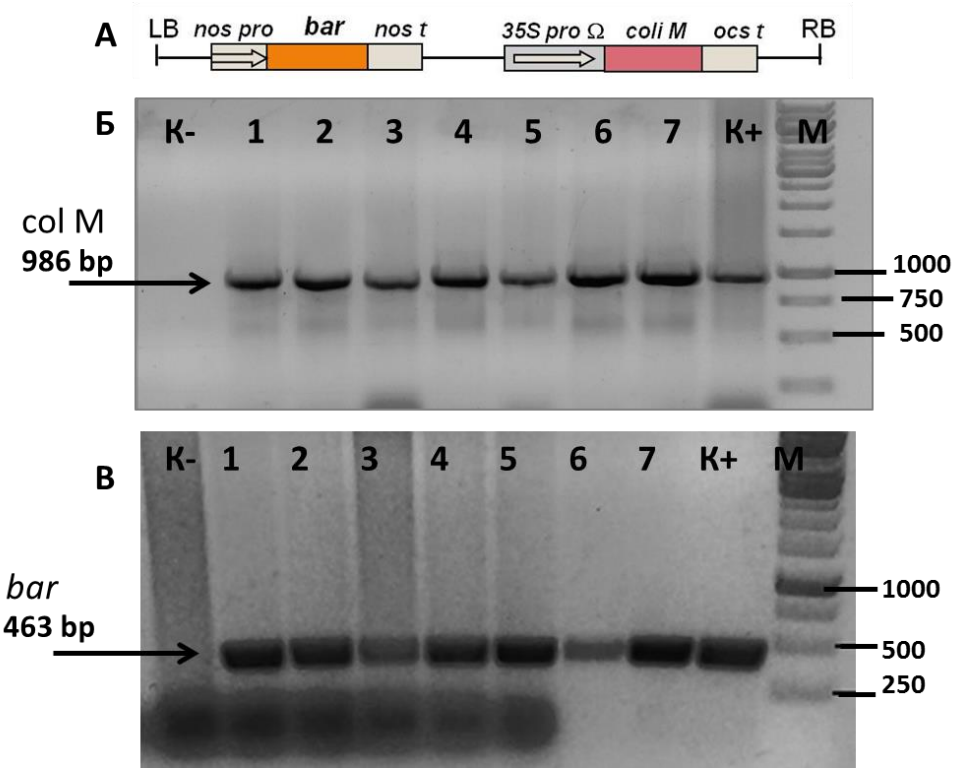


Рисунок 4.1. Схематичне зображення генетичного вектору (А) та електрофореграма результатів ПЛР аналізу геномної ДНК моркви з використанням праймерів до гена *col*M (Б) та *bar* (В):

М– ДНК маркер O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); К + – позитивний контроль (плазмідна ДНК вектору); К-- негативний контроль (нетрансгенна рослина); 1,2 – ПЛР фрагменти гена *col*M в складі геномної ДНК рослин моркви; 3-5 – ПЛР фрагменти гена *col*M в складі геномної ДНК рослин мізуни; 6,7 - – ПЛР фрагменти гена *col*M в складі геномної ДНК рослин капусти броколі.

Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин проводили аналіз за допомогою ПЛР з праймерами до генів *bar* та *col*M. На

рис. 4.1. представлені схематичне зображення вектору, який був використаний для трансформації (рис. 4.1.-А), та результати аналізу за допомогою ПЛР рослин моркви, капусти броколі та мізуни. Всього в роботі було проаналізовано та підтверджено наявність гену коліцину в трансгенних рослинах 5-и різних видів їстівних рослин та модельної рослини – тютюну. В даному звіті ми не наводимо фотографії всіх електрофореграм з результатами ПЛР оскільки вони всі подібні між собою. Узагальнені результати аналізу за допомогою ПЛР трансгенних рослин, що містять у геномі ген коліцину представлені в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2. Узагальнені результати трансформації рослин 5 різних видів вектором, що містить ген коліцину М.

	рослина	Кількість отриманих регенерантів, стійких до фосфінотрицину	Кількість рослин, з підтвердженою інтеграцією гену коліцину М	Кількість рослин, з підтвердженою інтеграцією гену *bar*	Кількість відібраних трансгенних ліній
1.	Салат латук	29	23	28	22
2.	Капуста броколі	32	19	28	19
3.	Мізуна	2	2	2	2
4.	Морква	23	18	21	13
5.	Капуста кале	6	4	4	4
6.	Рукола	9	5	-	5

Наявність експресії гену коліцина М на рівні транскрипції перевіряли в трансгенних рослинах за допомогою методу ЗТ-ПЛР. Для виключення можливого хибного позитивного сигналу в результаті забруднення препаратів РНК геномною ДНК, перед постановкою реакції зі зворотньою транскриптазою проводили обробку виділеної тотальної РНК ферментом ДНКазою.

Результати проведеного аналізу представлені на рис. 4.2.

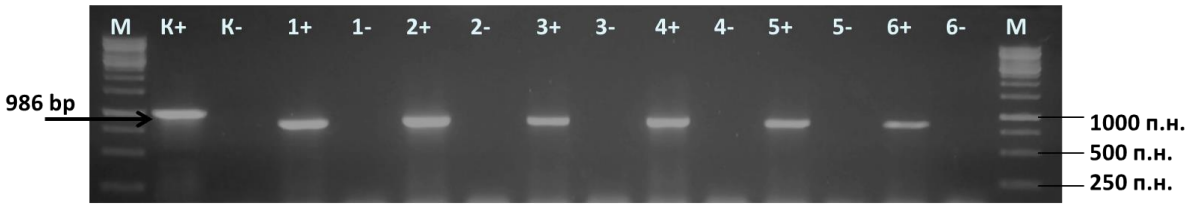


Рисунок 4.2. ЗТ-ПЛР-ампліфікація мРНК гена коліцину М, виділеної з трансгенних рослин:

М - ДНК маркер (п.н.), O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 1 - трансгенна РНК мізуни; 2+ - 6+ - РНК незалежних трансгенних ліній моркви, 2- - 6- негативний контроль для кожного зразка: та сама реакційна суміш без додавання зворотної транскриптази.

Доріжки з знаком «+» відповідають зразкам виділеної рослинної РНК, яка була використана для постановки реакції зворотньої транскрипції з використанням праймерів, компліментарних до полі-А хвоста мРНК. Треки зі знаком «-» - негативний контроль для кожного зразка: та сама реакційна суміш без додавання зворотної транскриптази. Зменшення розміру фрагменту, що ампліфікується з кДНК у порівнянні з позитивним контролем (доріжка К+ плазмідна ДНК) на нашу думку, пояснюється тим, що відбулось вирізання інтронів при дозріванні пре-мРНК.

В результаті проведених аналізів ЗТ-ПЛР експресія гетерологічного гену коліцин М на рівні транскрипції підтверджена для 6-ти ліній трансгенної моркви, двох ліній мізуни, 11-ти ліній салату.

4.2. **Аналіз успадкування трансгенів та трансгенних ознак у наступному поколінні трансгенних рослин салату та мізуни.**

Серед отриманих трансгенних рослин з геном коліцину М два види рослин – салат і мізуна – є однорічними і характеризуються коротким вегетаційним періодом. Крім того, обидва види розмножуються в

результаті самозапилення, що дало можливість отримати насіння в умовах теплиці та провести аналіз нащадків трансгенних рослин (F1). Зібране насіння мізуни та салату вводили в культуру *in vitro* шляхом поверхневої стерилізації. Насіння пророщували на безгормональному середовищі МС, яке містило селективний агент фосфінотрицин – 5 мг/л. Таким чином були зроблені висновки щодо успадкування однієї з трансгенних ознак – стійкості до гербіциду фосфінотрицину. При селекції нащадків трансгенних рослин салатів лише дуже незначна частина проростків не була стійка до фосфінотрицину (рис. 4.3.) і гинула на селективному середовищі. Ми не спостерігали з цією рослиною класичного розщеплення за домінантною ознакою 3:1. Майже всі проростки з насіння трансгенних салатів успадкували ознаку стійкості до фосфінотрицину.

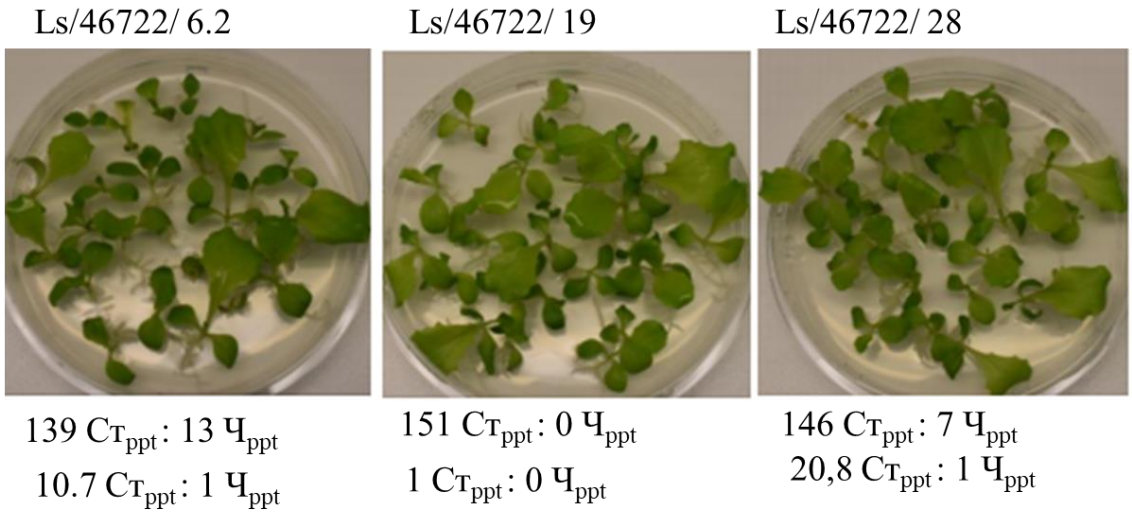


Рисунок 4.3. Розщеплення при успадкуванні ознаки стійкості до фосфінотрицину у наступному поколінні (F1) трансгенних рослин салату.

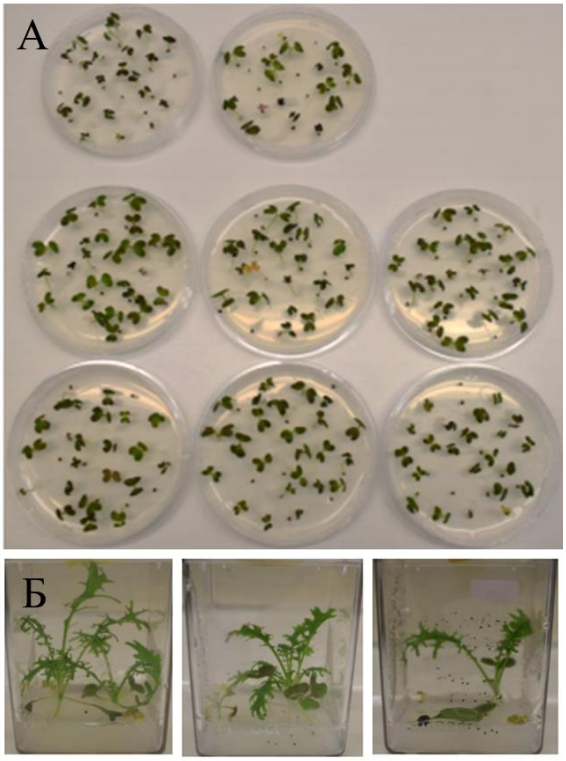


Рисунок 4.4. Розщеплення при успадкуванні ознаки стійкості до фосфінотрицину у наступному поколінні трансгенних рослин (А) та вирощування наступного покоління рослин мізуни *in vitro* (Б).

Для насіння трансгенних рослин мізуни ми спостерігали більш класичну ситуацію з розщепленням за ознакою стійкості до фосфінотрицину: при аналізі насіння лінії № 1 (рис. 4.4.) ми спостерігали 113 проростків стійких до фосфінотрицину і 30 нестійких рослин, що відповідає розщепленню 3:1. Таке успадкування трансгенної ознаки може свідчити про те, що після трансформації відбулась інтеграція в геном рослини лише однієї копії гену.

Відібрані на селективному середовищі трансгенні рослини салату і мізуни (F1) були перевірені за допомогою ПЛР для підтвердження наявності генів коліцину М та *bar* в їх геномі. Молекулярно-біологічний аналіз підтвердив трансгенну природу рослин, які були вирощені з насіння трансгенних ліній мізуни та салату.

4.3. **Підтвердження наявності рекомбінантного коліцину М в трансгенних рослинах салату та мізуни методом вестерн-блот.**

З метою підтвердження наявності коліцину М в рослинах салату та мізуни було проведено Вестерн-блот аналіз. Робота проводилась у співробітництві з компанією Nomad Bioscience GmbH (м.Галле, Німеччина). Білки, виділені з трансгенних рослин, були розділені за допомогою електрофорезу в 15% акриламідному гелі за денатуруючих умов. Після цього білки було перенесено на нітроцелюлозну мембрану. Білок коліцин М на мембрані детектували за допомогою поліклональних антитіл до даного білку, взятих у розведенні 1:10000 (Рис. 4.5.)

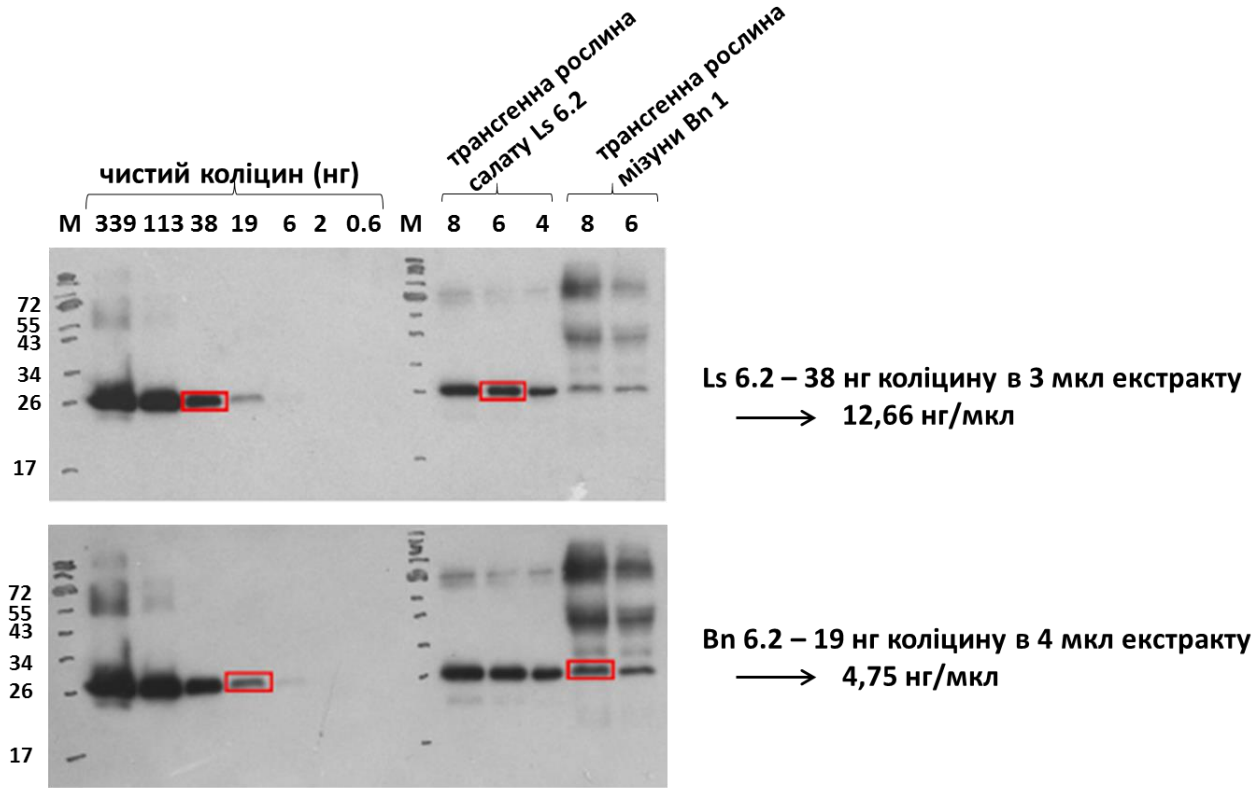


Рисунок 4.5. Результати вестерн-блот аналізу до білку коліцин М в білкових екстрактах трансгенних рослин салату та мізуни.

Чистий коліцин в різних концентраціях був використаний для кількісної оцінки вмісту рекомбінантного білку в рослинних екстрактах. Отримані в наших експериментах результати відповідають таким значенням вмісту коліцину М в трансгенних рослинах: 50 мкг коліцину М

на 1 г рослинного матеріалу для салатів та 20 мкг коліцину М на 1 г рослинного матеріалу для мізуни.

Паралельно проводили тестове визначення антибактеріальної активності відповідних екстрактів. Відзначено, що коліцин М у помітних кількостях міститься у екстрактах всіх досліджуваних трансгенних рослин, що виявляли антибактеріальну активність, і відсутній у рослинах, що такої активності не виявляли.

4.4. Молекулярно-біологічний аналіз трансгенних рослин томатів, що містять ген інтерферону людини альфа 2b.

Рослини-регенеранти томатів, після трансформації вектором pCB124, що містить ген інтерферону під контролем конститутивного 35S промотора, було відібрано на середовищі МС, в яке додавали 100 мг/л канаміцину. Зі стійких рослин були відібрані зразки для проведення молекулярно-біологічного аналізу за допомогою ПЛР з праймерами специфічними до генів HuIFNα-2b та *npt* II (Табл. 4.1.). ПЛР аналіз підтвердив інтеграцію обох генів у геном рослин, оскільки на електрофореграмах фрагмент відповідного розміру був присутній при аналізі трансгенних ліній і відсутній в контролі (Рис. 2.6).

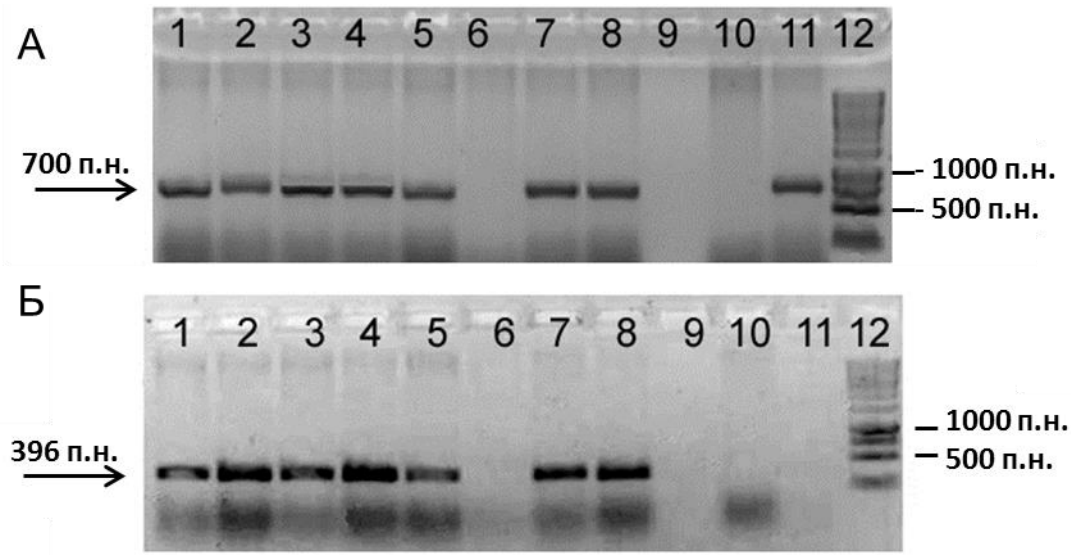


Рисунок. 4.6. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК трансгенних томатів з праймерами до *npt* II (А) та *HuINF-α2b* (Б) гена: 1-5 – T_1 покоління трансгенного клону №2 сорту Ляна (трансформованого вектором pCB 124), насіннєві лінії 2, 3, 4, 5, 6; 6 – Шедевр, контроль не трансгенний; 7-8 – T_1 покоління трансгенного клону №2 сорту Шедевр, насіннєві лінії 1, 2, відповідно; 9 – немає ДНК, 10 – Ляна контроль трансгенний; 11 – трансгенний *Nicotiana tabacum*; 12 – маркер молекулярної маси Fisher Thermo Scientific GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

4.5. Успадкування гетерологічних генів HuINFα-2b та nptII у Т1 поколінні трансгенних томатів.

В грунт було висаджено незалежні лінії трансгенного томата з геном *HuINF-α2b*: сортів Ляна і Шедевр (рис. 2.7). Відбирали найбільш інтенсивно зростаючі рослини та зібрали насіння з чотирьох різних трансгенних рослин T_0.

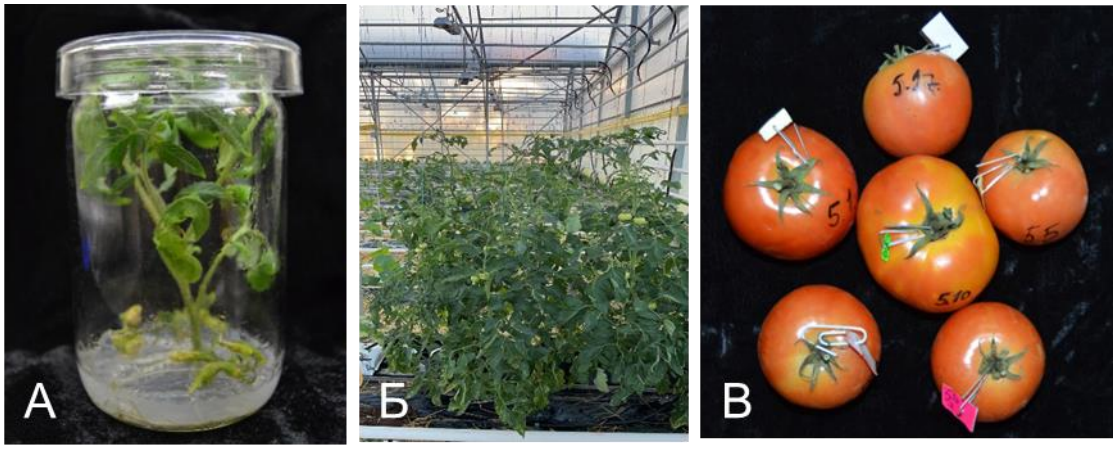


Рисунок 4.7. Трансгенні рослини томатів з геном інтерферону альфа 2b людини *in vitro* (А) та в теплиці (Б); В - плоди трансгенного томату з геном інтерферону (сорт Шедевр 1).

Успадкування трансгену та передбачувану сегрегацію визначали за допомогою тесту на стійкість до канаміцину. Зелені рослини, що

утворюють коріння та калюси, що активно росли, оцінювали як стійкі до канаміцину. Стійкі лінії додатково аналізували методом ПЛР. Проаналізовано успадкування гетерологічних генів у T_1 нащадків цих трансгенних ліній. Аналіз проводили з використанням селективного агента канаміцину (100 мг/л) (рис. 4.8). Кількість стійких та чутливих до канаміцину рослин наведено в таблиці 4.3.

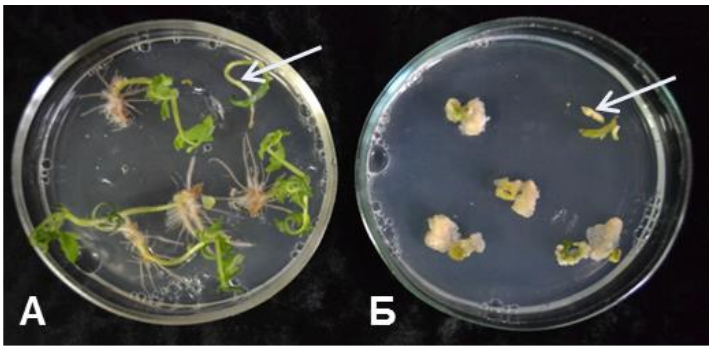


Рис. 4.8. Розщеплення в насіннєвому потомстві трансгенних рослин томату на селективних середовищах зі 100 мг/л канаміцину: ліворуч верхівки 5 сіянців на середовищі для укорінення та праворуч - гіпокотилі з цих рослин на середовищі для калюсогенезу. Нестійкі рослини позначено стрілками.

Таблиця 4.3. Успадкування гетерологічного гена *nptII* в T_1 поколінні незалежних клонів рослин томата, трансформованих вектором pCB124

Сорт	Трансгенний клон	Стійкі рослини	Нестійкі рослини
Шедевр 1	2	60	21
	4	11	1
	13	55	10
Ляна	2	44	15

Аналіз сегрегації гену *nptII* згідно з методом χ–квадрат, дозволяє припустити, що вставка однієї копії Т–ДНК у геном аналізованих трансгенних рослин томатів є

статистично значущою (P ≤ 0,05).

ПЛР-аналіз підтвердив наявність гена *nptII* у всіх стійких до канаміцину рослин. ПЛР-аналіз з праймерами до гена *HuINF-α2b* показав спільну сегрегацію обох генів у аналізованих рослинах.

4.6. Аналіз експресії генів *HuINFα-2b* та *nptII* в трансгенних томатах.

Для визначення транскрипції гетерологічних генів *HuINFα-2b* та *nptII* в трансгенних томатах було проведено виділення тотальної мРНК з листя та плодів контрольних та трансгенних рослин та подальшу ампліфікацію за допомогою ЗТ-ПЛР (рис. 4.9).

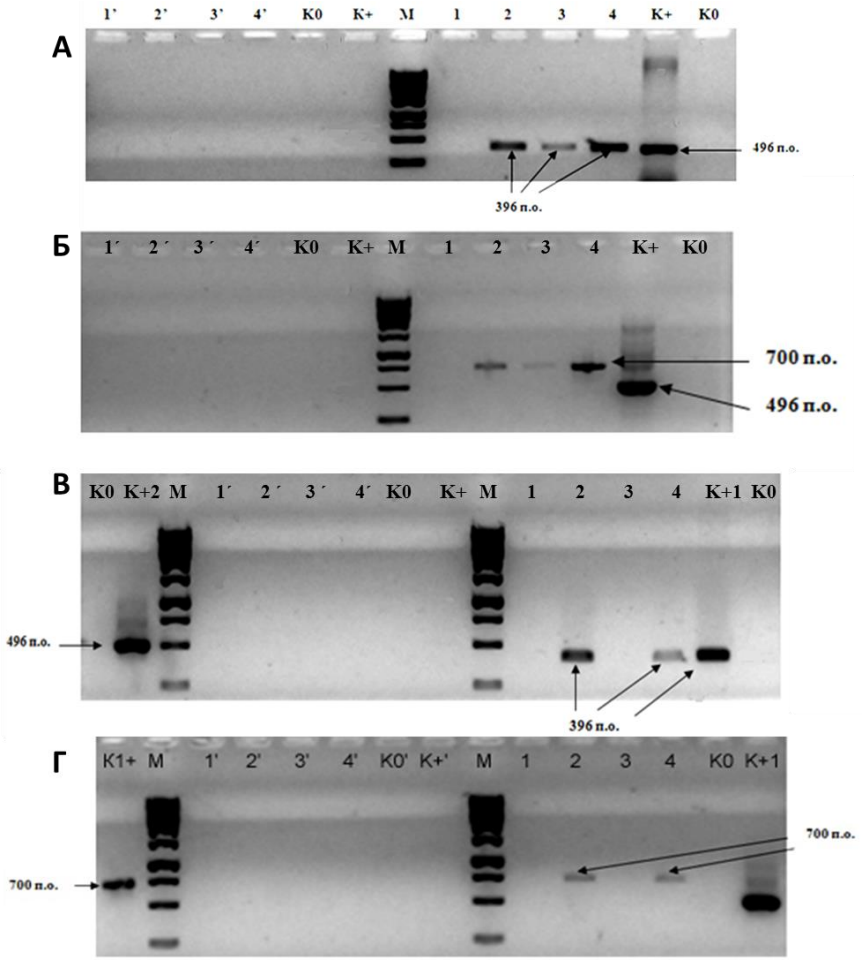


Рис. 4.9. Електрофореграми продуктів ампліфікації кДНК з листя (А, Б) та плодів (В, Г) трансгенних томатів сорту Шедевр до генів *HuINF-α2b*

(А,В) та *nptII* (Б, Г). 1 – кДНК після зворотної транскрипції РНК не трансгенного томату (К-); 2 – 4 – відповідні трансгенні лінії. К - ядерна ДНК ампліфікована з праймерами до *HuINF-α2b* гена. К+ - кДНК GAPDH (людський ген був у наборі кіта) – розмір 496 п.о.; К0 – контроль без додавання кДНК (в мікс який використовували для зворотної транскрипції не вносили РНК), потім мікс, який проходив такі самі етапи зворотної транскрипції як і експериментальні зразки, додавали у мікс для ампліфікації (ПЛР); М - маркер молекулярної маси Fisher Thermo Scientific GeneRuler™ DNA Ladder Mix. На доріжках позначених ’ – кДНК отримана після зворотної транскрипції РНК без додавання фермента зворотньої транскриптази.

Аналіз показав присутність мРНК в листі всіх проаналізованих трансгенних клонів та відсутність у контрольних нетрансгенних томатах. При аналізі плодів ампліфікацію за допомогою ЗТ-ПЛР отримали лише в 2 з 3 проаналізованих трансгенних ліній, що, можливо, пов’язано з низьким рівнем експресії гена в цій лінії, оскільки дана лінія при аналізі листя давала менш інтенсивний сигнал порівняно з двома іншими.

Отже, в отриманих трансгенних томатах двох різних сортів була доведена інтеграція в геном гена інтерферону людини α2b та селективного гену *npt* II. Також була підтверджена експресія трансгенів на рівні транскрипції за допомогою методу ЗТ-ПЛР. Аналіз успадкування трансгенів у першому поколінні (F1) нащадків, отриманих в результаті самозапилення, показав, що інтеграція Т-ДНК в геном томата відбувалася однокопійно. Трансгени успадковувалися та експресувалися в рослинах T_1 покоління, що дозволяє розмножувати ці рослини насіннєво, та зберігати їх колекцію у вигляді насіння, а не вегетативного матеріалу.

РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ ТРАНСГЕННИХ ТОМАТІВ З ГЕНОМ *HUIFNA2B*

5.1. Визначення біологічної активності інтерферону

Дослідження було проведено згідно ДФУ для визначення активності інтерферону. Використана модельна тест-система, що складалася із перещеплюваних клітин МА104 (епітеліальні клітини нирки *Cercopithecus aethiops,* MA-104 Clone 1 (ATCC® CRL-2378.1™)) та вірусу везикулярного стоматиту (ВВС, АТСС № VR-158) з інфекційним титром не нижче 10^5 $ТЦД_{50}$/0,1 мл. (На культурі клітин МА104 проведено більше 8 пасажів вірусу везикулярного стоматиту із стабільним титром вірусу). Вказана тест-система відповідає вимогам USP «*Draft Guidance for Industry on Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics; Availability*» (2014).

Визначення інтерфероніндукуючої активності у зразках проводили методом мікротитрування. У 96-лункові планшети зі сформованим моношаром клітин МА104 вносили послідовні двократні розведення зразків, починаючи від 1:10 до 1:1280. Через 24 години клітини інфікували ВВС у дозі 100 $ТЦД_{50}$ у 50,0 мкл середовища DMEM/F12. Залишали по 4 лунки для контролю вірусу (необроблені клітини, інфіковані ВВС) та для контролю клітин (необроблені клітини, неінфіковані ВВС). Планшети культивували при 37^0С впродовж 24 год у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Облік кількості живих клітин проводили після їх фарбування кристалічним фіолетовим. Для цього з лунок видаляли надосадову рідину у дезінфікуючий розчин, а до клітин на 7-10 хв вносили 0,2 % розчин барвника Crystal Violet («Sigma», США) в 2 % етанолі. Барвник видаляли, а зафарбований моношар клітин промивали під проточною водою. Оптичну густину зафарбованих клітин вимірювали на спектрофотометрі з вертикальним променем Multiskan Ascent («Thermo

Labsystems», Фінляндія) при довжині хвилі 540 нм. Морфологію клітинної культури та вірусний цитопатичний ефект у лунках, що містять екстракти контрольних та трансгенних томатів та стандартний ІФН у різних розведеннях, вивчали в 96-лунковому мікропланшеті за допомогою світлового мікроскопа (Zeiss, Axiophot, Західна Німеччина). Мікрофотографії були зроблені камерою M3CMOS 10000 (Sigeta). Обробку мікрофотографій проводили за допомогою програмного забезпечення для обробки зображень Toup View. Для мікроскопії мікропланшет поміщали догори дном.

Досліди проведені двічі, кожна експериментальна точка отримана як медіана із чотирьох значень. Відсоток живих клітин визначали за формулою:

$$Д = (ОгК – ОгЕ)/(ОгК-ОгВ)х100, \text{ де}$$

ОгЕ – значення оптичної густини експериментальної лунки, ОгК – значення оптичної густини в лунці контролю клітин, ОгВ – значення оптичної густини в лунці контролю вірусу.

Результати приймали до уваги тільки в тому випадку, коли в контрольних культурах, що не містять вірусу, цитодеструктивні зміни відсутні (100% живих клітин), а в контролі вірусу – повна деструкція клітин (80-100% загибель клітин).

Як препарат порівняння було використано стандартний зразок інтерферону WHO International Standard INTERFERON ALPHA 2b*(Human rDNA derived)* NIBSC code: 95/566 (референс-препарат). Активність зразка становила 1000 МО/мл.

Після стандартизації досліджуваних зразків за концентрацією білка їх вносили в об’ємі 1/10 від об’єму поживного клітинного середовища: 10 мкл зразка до 90 мкл поживного середовища для культур клітин у плашеті зі сформованим моношаром клітин МА104.

Статистичну обробку отриманих значень проводили, розраховуючи

медіану, перший і третій інтерквартильний діапазон.

5.2 Визначення активності інтерферону у трансгенних ліній томатів сорту Шедевр 1 з геном *HuIFNα-2b*

В нащадках T_1 покоління трансгенного сорту томата Шедевр 1 було проведено аналіз біологічної активності інтерферону. Оцінено вплив неочищених екстрактів плодів і листя на зниження цитопатичної дії вірусу на епітеліальні клітини африканської зеленої мавпи (рис. 5.1.). Екстракти готували з тканин трансгенного потомства первинних трансформантів томата ліній № 2, 4, 13 та томата дикого типу цього ж сорту. Як показано в таблиці 1, активність інтерферону в трансгенних рослинах HuIFNα-2b була успішно виявлена. Навіть після зберігання протягом 3 місяців спостерігали високу біологічну активність інтерферону в трансгенних плодах томатів лежкого сорту Шедевр 1. Оптичний мікроскопічний аналіз клітинного моношару підтвердив захисну дію екстрактів, отриманих з рослин, що експресують ген інтерферону, порівняно з екстрактами рослин дикого типу. Інтактний клітинний моношар культури епітеліальних клітин МА-104 Клон 1 (ATCCR CRL-2378.1тм) та цитопатична дія ВВС (ATCC № VR-158) на ці клітини продемонстровані на рис.5.2. Вплив референтного інтерферону (міжнародного стандарту ВООЗ на HuIFNalpha-2b), отриманого з рДНК, та рослинних екстрактів (контролю та з трансгенних рослин, що експресують ген *HuINFα-2b*) на взаємодію ВВС з культурою клітин МА-104 показано на рис. 5.3.

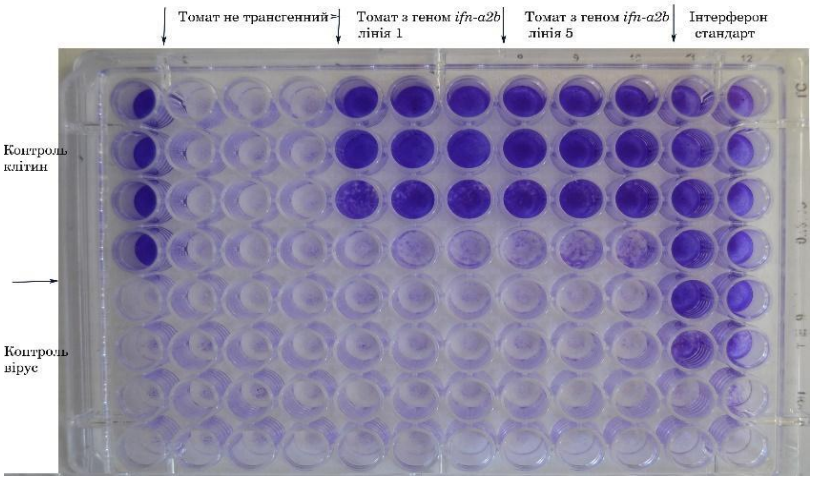


Рисунок 5.1. Захисний ефект неочищених екстрактів з трансгенних томатів, що експресують ген *HuIFNα-2b*, проти цитопатичного ефекту вірусу везикулярного стоматиту на встановлену культуру епітеліальних клітин нирки МА-104 у 96-лунковому мікропланшеті для культури клітин.

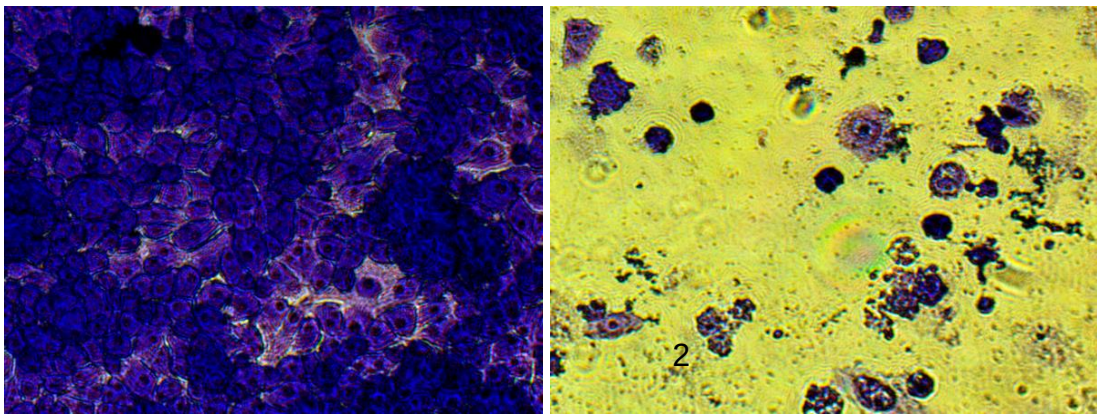


Рисунок 5.2. Морфологія культури клітин інтактної епітеліальної нирки МА-104 африканської зеленої мавпи (*Cercopithecus aethiops*) (ліворуч) та цитопатичний вплив вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) на неї (праворуч), збільшення 200х.

В таблиці 5.1 наведено результати визначення активності інтерферону в зразках екстрактів плодів та листків різних ліній томатів. Лінії відрізнялися між собою за активністю. Показано, що найвища активність була виявлена в екстракті з листя лінії T_0N13T_11 і становила $854{,}0\times10^3$ МО/г сирої маси. В екстракті плодів найвища активність була в

лінії T_0N4T_13. В подальшому потрібна перевірка гіпотези про те, чи залежить активність екстракту від кількості копій гена в рослині (гомо- чи гетерозиготний стан).

Таблиця 5.1. Показники активності інтерферону в зразках свіжих листків та плодів трансгенних рослин томатів сорту Шедевр

Матеріал для екстракції	**Первинний трансформант, T_0**	**Нащадки, T_1**	**Питома активність, $\times10^3$ МО/мг білка**	**Активність, $\times10^3$ МО/г СирМ**
Листки	Контроль, нетрансгенний	-	0	0,0
	N2	1	2,5	59,8
	N2	1	4,9	**127,3**
	N2	2	3,8	45,2
	N2	6	2,0	39,4
	N4	3	4,2	82,7
	N4	5	32,5	**146,4**
	N13	1	41,9	**854,0**
	N13	5	21,1	**139,6**
	N13	11	5,31	**143,5**
	N13	31	23,3	**420,1**
Плоди	Контроль, нетрансгенний	-	0	0
	N2	1	5,8	2,2
	N2	2	2,7	0,8
	N2	6	9,8	3,7
	N4	3	41,3	**14,9**
	N4	5	21,0	**13,9**
	N13	11	10,3	3,1
	N13	31	13,4	**10,1**

Плоди томатів зберігали біологічну активність інтерферону щонайменше три місяці за умови зберігання при помірній кімнатній температурі.

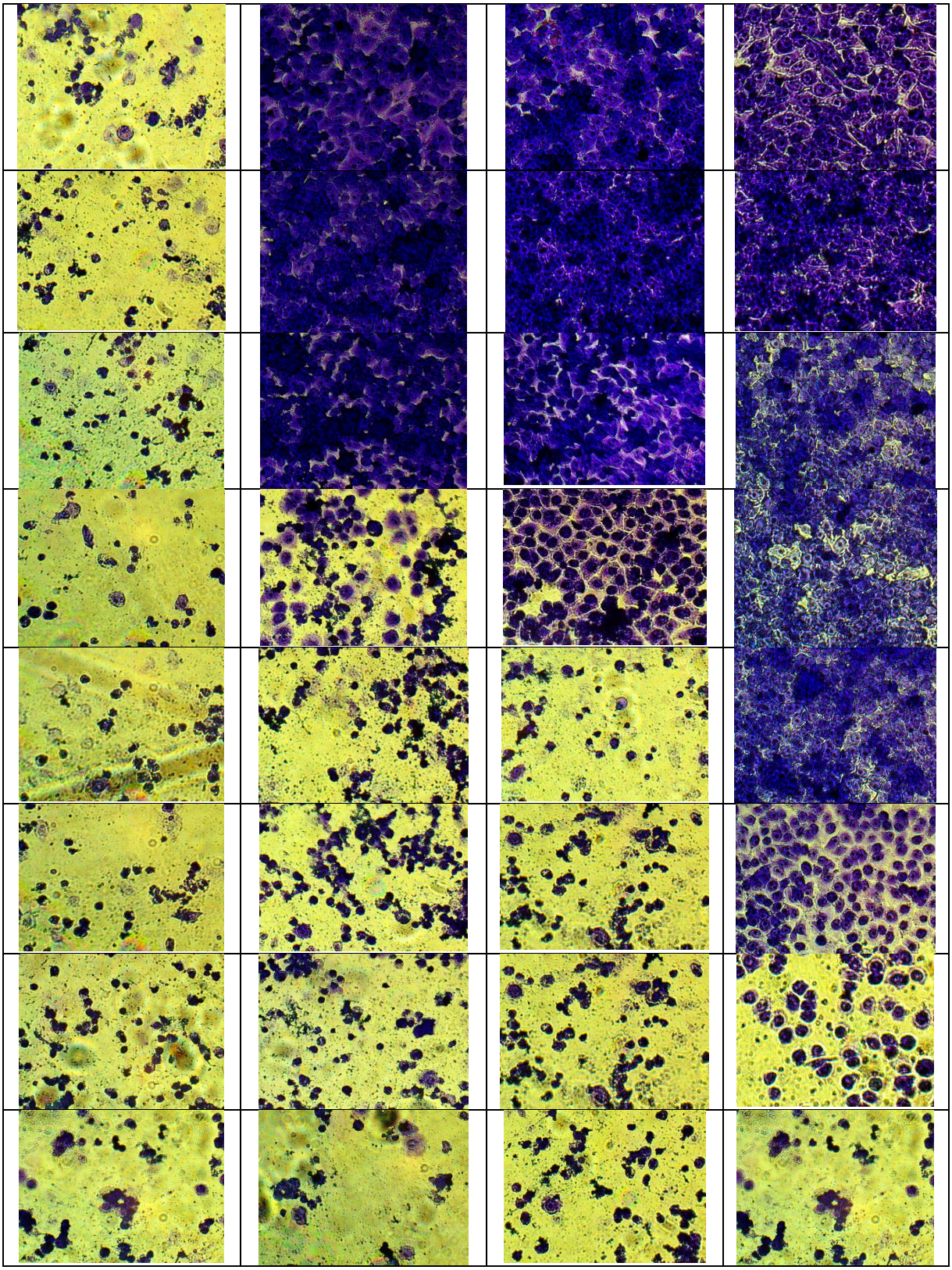


Рисунок 5.3. Біологічна активність рослинного інтерферону-α2b *in vitro*. Інтерферон, який експресується в трансгенних томатах з геном *HuIFNα-2b*, пригнічує цитопатію, спричинену вірусом везикулярного стоматиту, в культурі епітеліальних клітин нирки MA-104 MA-104,

збільшення 200х. Перша колонка - водний екстракт свіжих плодів томатів дикого типу, друга і третя - екстракти свіжих плодів трансгенних томатів, трансгенні лінії 1 і 5 відповідно; четверта колонка - стандартний розчин HuIFNα-2b.

5.3. Збереження активності інтерферону людини в екстрактах з трансгенних томатів при різних способах висушування.

З метою визначення можливості зберігання інтерферону людини α-2b у висушених рослинних зразках було проведено дослідження біологічної активності інтерферона, синтезованого в тканинах томата. Висушування проводили методом ліофілізації та методом низькотемпературної термічної сушки при температурі +40°С. При дослідженні біологічної активності інтерферону в листках провели перерахунок активності у висушених зразках на еквівалент 1 г сирої маси. Показники активності інтерферону подано у Таблиці (табл. 5.2). Ми спостерігали лише незначне її зниження у зразках, висушених ліофільно, порівняно зі свіжими, та майже 9-ти кратне зниження - у висушених термічно. При цьому біологічна активність інтерферону в сухих зразках листя була досить значною, і становила $0{,}5\times10^6$ МО/г сухої маси у висушеному ліофільно зразку. Таким чином, ліофільне висушування дозволяє ефективно зберігати фармацевтичний білок та його високу біологічну активність.

При аналізі активності інтерферону виділеного з висушених плодів томата, виявили надзвичайно високі показники активності при перерахунку на еквівалент 1 г сирої маси. Ймовірним поясненням цього може бути краща екстракція інтерферону (при подрібненні сухих зразків плодів) з апопласту, в той час як протеази залишалися іммобілізованими в клітинах, і не руйнували білок, який нас цікавить. Активність інтерферону

в ліофільно висушеному зразку трансгенного томата Шедевр 1 T_0 №13 T_1 №1 становила понад 1×10^6 МО/г сухої маси.

Таблиця 5.2. Показники активності інтерферону в зразках свіжих та висушених листків та плодів трансгенних рослин томатів сорту Шедевр 1.

Опис зразка	**Активність стока, ×10³ МО/мл**	**Питома активність стока, × 10³ МО/мг білка**	**Активність інтерферона, ×10³ МО/г сирої маси**	**Активність інтерферона, ×10³ МО/г Сух М**	**Активність інтерферона в сушених зразках еквівалентних 1 г сирої маси, ×10³ МО/г СирМ**
Контроль висушене ліофільно листя	0	0	0	0	-
Листки трансгенного томата Шедевр 1 T_0 №13 T_1 №5 **свіжі**	30,4	3,0	91,1	-	-
Листки трансгенного томата Шедевр 1 T_0 №13 T_1 №5, **висушені ліофільно**	31,5	31,5	-	497,5	67,2
Листки трансгенного томата Шедевр 1 T_0 №13 T_1 №5, **висушені в сушильній шафі при+40ºС**	5,5	6,5	-	86,9	11,7
Плоди трансгенного томата Шедевр 1 T_0 №13 T_1 №1, **висушені ліофільно**	69,9	155,4	-	1165,5	209.8
Плоди трансгенного томата Шедевр 1 T_0 №13 T_1 №1, **висушені в сушильній шафі при+40ºС**	36,1	70,8	-	601,7	108.3
Плоди трансгенного томата Шедевр 1 T_0 №13 T_1 №5, **висушені ліофільно**	36,9	59,1	-	615,6	110,8

Плоди трансгенного томата Шедевр 1 T_0 №13 T_1 №5, **висушені в сушильній шафі при+40°С**	9,0	38,2	-	149,4	26,9
міжнародний зразок референс-препарату інтерферону	1,0	нв	**нв**	-	-

Досліджували показники активності інтерферону людини α-2b в зразках свіжих листків та плодів трансгенних рослин томатів сортів Шедевр 1 та Ляна. Порівняння показало, що біологічна активність інтерферону була в сотні разів вища в ліній сорту Шедевр 1, ніж сорту Ляна (табл. 5.3). Таким чином, трансгенні лінії томатів сорту Шедевр 1, становлять інтерес не лише завдяки здатності до збереження у них біологічної активності інтерферону протягом тривалого часу, а й завдяки надзвичайно високим показникам його активності.

Таблиця. 5.3. Максимальні значення активності інтерферону (ІФН) в зразках екстрактів плодів та листя томатів сортів Шедевр 1 та Ляна

Зразок	**Активність інтерферону, $\times 10^3$ МО/г СирМ**
Листя (Шедевр 1)	до 853,9
Плоди (Шедевр 1)	до 14,9
Листя (Ляна)	до 1,1
Плоди (Ляна)	до 0,4

Було проведено реакції нейтралізації активності екстрактів томатів з антитілами до інтерферону. Досліджували зразки екстрактів з листя та плодів з ліній T_0N13T_131 та T_0N4T_13, відповідно. Крива титрування активності екстрактів з тканин трансгенних томатів, при додаванні

моноклональних протиінтерферонових антитіл, принципово збігається з кривою титрування референтного зразка інтерферону людини HuIFNα-2b. Це доводить, що біологічна активність обумовлена саме інтерфероном людини.

Наші дані підтверджують правильну транскрипцію та трансляцію гена *HuINF-α2b* у рослинах томатів та активність інтерферону *in vitro*. Ген *HuINFα-2b* зберігає свою ефективність в наступному поколінні рослин; негативного впливу на ріст, розвиток і врожайність рослин не спостерігається. Результати демонструють, що біологічно активний цитокін людини з потенційним фармацевтичним застосуванням може бути експресований у трансгенних рослинах томатів.

5.4. Визначення продуктивних трансгенних ліній томатів та порівняння отриманих результатів з опублікованими даними.

Серед досліджених ліній томату слід виділити ті, які мали найвищу активність інтерферону в плодах. Зокрема це лінії T_0N4T_13, T_0N4T_15, T_0N13T_11, T_0N13T_15, T_0N13T_131. В цілому, лінії-нащадки первинного трансформанта T_0N2 проявляли меншу активність інтерферону порівняно з нащадками трансформантів №4 та №13. З найпродуктивніших ліній було зібрано насіння для подальших досліджень.

Томат є модельною рослиною для генетичних змін [38]. Помідори вже раніше використовували для експресії імовірних пероральних вакцин та інших фармацевтичних білків. Препарати рослинного білка з томатів, що вводилися перорально, продемонстрували ряд імунних реакцій [39]. Клітини рослин були схвалені FDA (U.S. Food and Drug Administration) для економічно ефективного виробництва білкових препаратів у великомасштабних поточних гідропонних установках для вирощування за нормами належної виробничої практики (GMP - Good Manufacturing

Practice). У ліофілізованих рослинних клітинах білкові препарати стабільні при температурі навколишнього середовища протягом кількох років, зберігаючи їх конформацію та ефективність. Після перорального введення білкові препарати, біоінкапсуловані в рослинних клітинах, захищені в шлунку від кислот і ферментів, але згодом вивільняються в просвіт кишечника мікробами, які перетравлюють клітинну стінку рослин. Велика площа слизової оболонки кишечника людини є ідеальною системою для пероральної доставки ліків [40].

Найвищий рівень накопичення інтерферону серед систем рослин, що експресують інтерферон, спостерігали в транспластомному тютюні. Він досягав до 3 мг/г свіжої маси в листках [41]. Рівень біологічної активності інтерферону, отриманий в трансгенних плодах томатів сорту Шедевр 1 знаходиться в одному ряду, або навіть переважає отримані в інших трансгенних рослинних системах, які використовували для біосинтезу інтерферону, таких як рис [42], ряска [43], морква [44], алое [45], салат (ендивій) [46], картопля [47], ріпак [48]. Активність інтерферону у трансгенних рослин сорту Ляна була подібною до тих значень активності, що отримані іншими дослідниками. Серед систем експресії інтерферону, де застосовували стабільну ядерну трансформацію рослин, отримані рослини томатів сорту Шедевр 1 продемонстрували одну з найвищих біологічних активностей інтерферону в тканинах. Було виявлено, що максимальний вміст інтерферону у листках значно вищий (приблизно в 40-50 разів), ніж у тканинах плодів тих самих рослин. Різниця в активності інтерферону між тканинами плодів і листків зменшувалася, коли активність інтерферону розраховували в МО активності інтерферону на мг загального білка (таблиця 5.3). Це може бути пов’язано з більшим вмістом білка в листі та фізіологічним станом рослин. Ген рекомбінантного людського інтерферону α-2b (*HuINFα-2b*) у векторі був злитий із кальретикуліновим сигналом транспорту в апопласт (рис.

1.7). Білки з цією сигнальною послідовністю транспортуються в такі субклітинні компартменти, як апарат Гольджі, ендоплазматичний ретикулум, плазматичні мембрани та апопласт [49, 50]. Переважна локалізація білка, що становить інтерес, у апопласті - поза цитоплазмою - запобігає потраплянню білка під дію клітинних протеаз рослин. Крім того клітинні стінки захищають цей білок від деградації у верхніх і середніх відділах шлунково-кишкового тракту ссавців [40].

Відповідно до результатів біологічної активності інтерферону можна припустити, що рівні експресії в рослинах T_1, що несуть трансген, були подібними до тих, що в рослинах T_0.

В роботі використовували рослини *Solanum lycopersicum* L. сорту Шедевр 1, що містить мутантний ген *alc*, який значно подовжує термін придатності плодів через відносно низький рівень ендогенного етилену та низьку активність полігалактуронази та поліметилгалактуронази [51]. У наших дослідах плоди Шедевр 1 зберігалися протягом трьох місяців і протягом цього періоду у трансгенних рослин зберігалася біологічна активність інтерферону. Тривалий термін зберігання без втрати активності дозволяє продовжити період переробки плодів відповідно до GMP.

5.5. Визначення біологічної дії інтерферону, синтезованого в трансгенних томатах, на мишей лінії balb/c

Для вивчення біологічної активності інтерферону людини синтезованого в томатах, було проведено експеримент по зараженню вірусом везикулярного стоматиту (ВВС) самців лабораторних мишей лінії balb/c віком 7 тижнів в умовах годівлі чистим повнораціонним комбікормом (групи К, ВВС), комбікормом з додаванням плодів томатів оригінального сорту Шедевр 1 (групи К+томат, ВВС+томат) або комбікорм з додаванням томатів сорту Шедевр 1, які експресують ген інтерферону людини (групи К+ІФН, ВВС+ІФН). Для згодовування було

обрано плоди сорту Шедевр 1 T_0 N4 T_1 N3. Біологічна активність інтерферону в плодах цієї лінії становила 14879,6 МО/г сирої ваги.

Дослідні групи були сформовані з молодих самців за три дні до зараження. Групи, які заражали вірусом, складалися з 9 мишей, незаражені - з 8. Томати згодовували груповим методом, поїдання відбувалося *ad libitum*. Томати, як з інтерфероном, так і контрольні, згодовували мишам протягом трьох діб. Першу дозу томатів вони отримували за вісім годин до зараження вірусом везикулярного стоматиту. Моделювали хронічну інфекцію, для чого заражали мишей внутрішньоочеревинно та інтраназально. Вірус нарощували на культурі клітин миші L-922. Титр вірусу становив 1×10^3.

Напередодні досліду, у мишей прибирали воду на 12 годин та витримували на голодній дієті, після чого ставили поїлки в контрольні групи, яким не згодовували томати, а групам яким згодовували томати давали наважки м'якоті плодів томатів без насіння. З'їдену дозу томатів розраховували, зважуючи залишки після 3 год поїдання в першу добу, а в подальшому через 5 годин. Комбікорм всім групам та воду тим групам, які їли томати, повертали в першу добу через 3 год. Наступні два дні комбікорм та воду забирали лише на 8 год. Їжу тоді насипали в годівниці одночасно з томатами, воду ставили через годину. Таким чином, у мишей були присутні одночасно вода, корм і томати. Маса з'їдених мишами томатів та отримана доза інтерферону наведена в таблиці 5.4.

Таблиця 5.4.Споживання контрольних та трансгенних томатів мишами з різних груп, г/гол за добу.

Група	**1-й день**		**2-й день**		**3-й день**		**Сумарна доза інтерферону протягом трьох**
	Середня вага з'їденого	**Середня доза інтерферон**	**Середня вага з'їденого**	**Середня доза інтерфе**	**Середня вага з'їденого**	**Середня доза інтерферон**	

	томата, г/гол	**у, ×10³ МО/гол**	**томата, г/гол**	**рону, ×10³ МО/гол**	**томата, г/гол**	**у, ×10³ МО/гол**	**днів, ×10³ МО/гол**
К+томат	2,71	0	2,10	0	5,7	0	0
ВВС+томат	2,34	0	3,74	0	4,87	0	0
К+ІФН	2,64	39,21	4,20	62,53	4,37	65,01	**166,74**
ВВС+ІФН	1,85	27,38	3,14	46,72	5,57	82,85	**156,94**

Після знайомства з новим кормом миші охоче поїдали томати навіть в присутності корму і води (рис. 5.4).

Рис.5.4. Поїдання трансгенних томатів мишами лінії balb/c.

В процесі досліду фіксували зміни в масі мишей шляхом зважування. Оцінювали приріст маси мишей через 3 дні. Оскільки миші були молоді, то ми спостерігали наростання маси тіла в групах, не заражених ВВС. Відмінності в прирості маси між групами, з різним раціоном були несуттєвими, та величина приросту не змінювалася протягом усього періоду експерименту. У заражених групах спостерігали тенденцію до

збільшення споживання їжі, і, відповідно, приросту маси одразу після зараження, та падіння приростів, або навіть втрата ваги по мірі розвитку інфекції (рис. 5.5). Статистичну обробку отриманих значень проводили, розраховуючи медіану, відхилення визначали як різницю між першим або третім інтерквартильним діапазоном та медіаною.

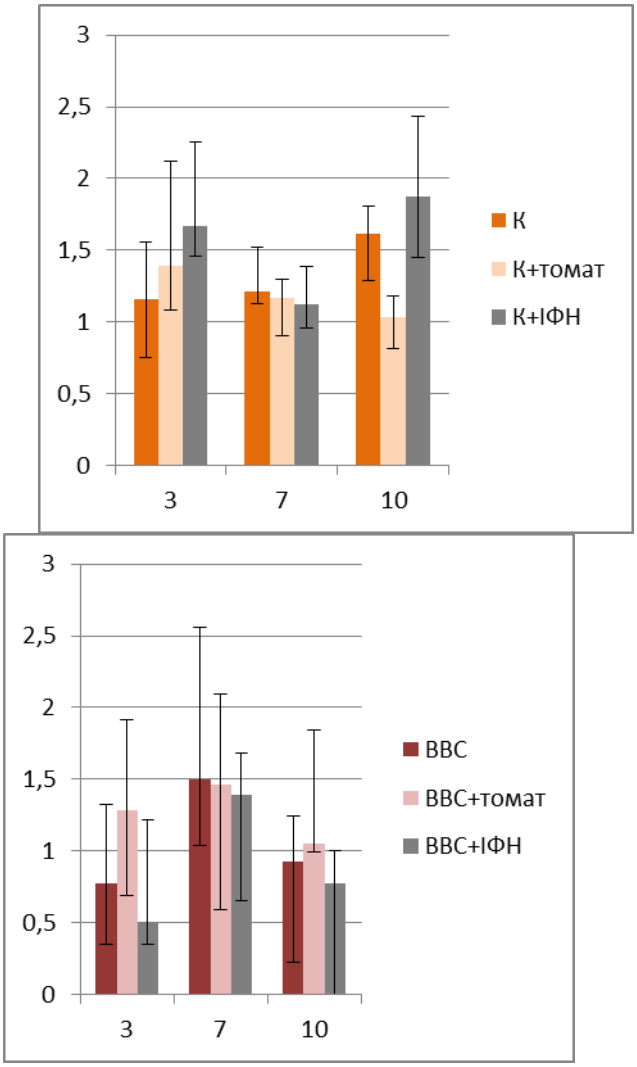


Рис. 5.5. Зміна приростів маси тіла мишей протягом експерименту у (А) інтактних та (Б) заражених вірусом везикулярного стоматиту (ВВС) групах мишей при різних раціонах годівлі, г.

Серед заражених мишей спостерігали смертність на 8-9 добу після інфікування в групах, які їли лише комбікорм або комбікорм з томатами (табл. 5.5). Серед інфікованих мишей з групи, яка їла трансгенні томати,

всі миші дожили до гострого закінчення досліду на 11 добу. В цій групі спостерігали зменшення споживання комбікорму, порівняно з аналогічними інфікованими групами. Спостерігали дещо менше споживання корму і у групі незаражених мишей, які їли трансгенні томати з інтерфероном. Можливо, це пов`язано з кількома факторами: 1) Обумовлене інтерфероном зниження біосинтезу білків призводило до зменшення приростів і, відповідно, потреби в кормі; 2) Доза інтерферону була занадто високою для мишей; 3) Використаний інтерферон був ксеногенним (людським, а не мишачим), і комбінація цього в поєднанні з високою дозою вели до алергізації та вплинули на апетит тварин.

Досліджували метаболічну активність перитонеальних макрофагів, клітин, які беруть участь у фагоцитозі та знаходяться в очеревині. Макрофаги відіграють важливу роль в виникненні імунної відповіді, як антигенпрезентуючі клітини та як фагоцити у вигляді виконавчої ланки. Було виявлено, що макрофаги мишей, які споживали трансгенні томати з інтерфероном, відповідали значним підвищенням метаболічної активності на інфекцію ВВС (табл. 5.5).

Таблиця 5.5. Вплив раціону годівлі на стійкість мишей лінії balb/c до вірусу везикулярного стоматиту

Група (годівля)	**Смертність,%**	**Підвищення активності перитонеальних макрофагів порівняно з незараженою, аналогічною по годівлі групою тварин, рази**
Комбікорм	22,2	1,05
Комбікорм + томати	11,1	1,54
Комбікорм + томати з інтерфероном (150×10^3 МО/3 доби)	0	2,18

Селезінка є периферійним органом лімфоїдного кровотворення та імунного захисту. Часто при вірусній інфекції її розміри збільшуються. Тому визначали індекс селезінки в різних групах тварин (рис. 5.6). Індекс визначали як відношення маси селезінки до маси тіла тварини. В незараженій групі мишей індекс маси селезінки був найвищий в групі, яка споживала томати з інтерфероном. Тоді як в заражених мишей, які отримували інтерферон з томатів цей показник був найменшим. Хоча різниця між цими даними статистично недостовірна, однак простежується певна тенденція. Можна припустити, що екзогенний інтерферон впливав на функціонування цього органу імунного захисту і викликав викликав посилення імунної відповіді у мишей. У незаражених мишей це приводило до спленомегалії. У заражених мишей, що їли томати з інтерфероном, при введенні вірусу внутрішньоочеревинно, ми спостерігали підвищений рівень активності перитонеальних макрофагів. Активація перитонеальних макрофагів екзогенним інтерфероном збільшувала їх поглинальну здатність. Така активація макрофагів, одна з функцій яких є презентація антигенів в лімфоїдні органи, ймовірно, приводила до масового вивільнення в кров вже активованих лімфатичних клітин, що проявлялося у вигляді зменшення маси у селезінки групі інфікованих мишей, що вживали томати з інтерфероном. Активна імунна відповідь приводила до збільшення виживаності інфікованих мишей цієї групи.

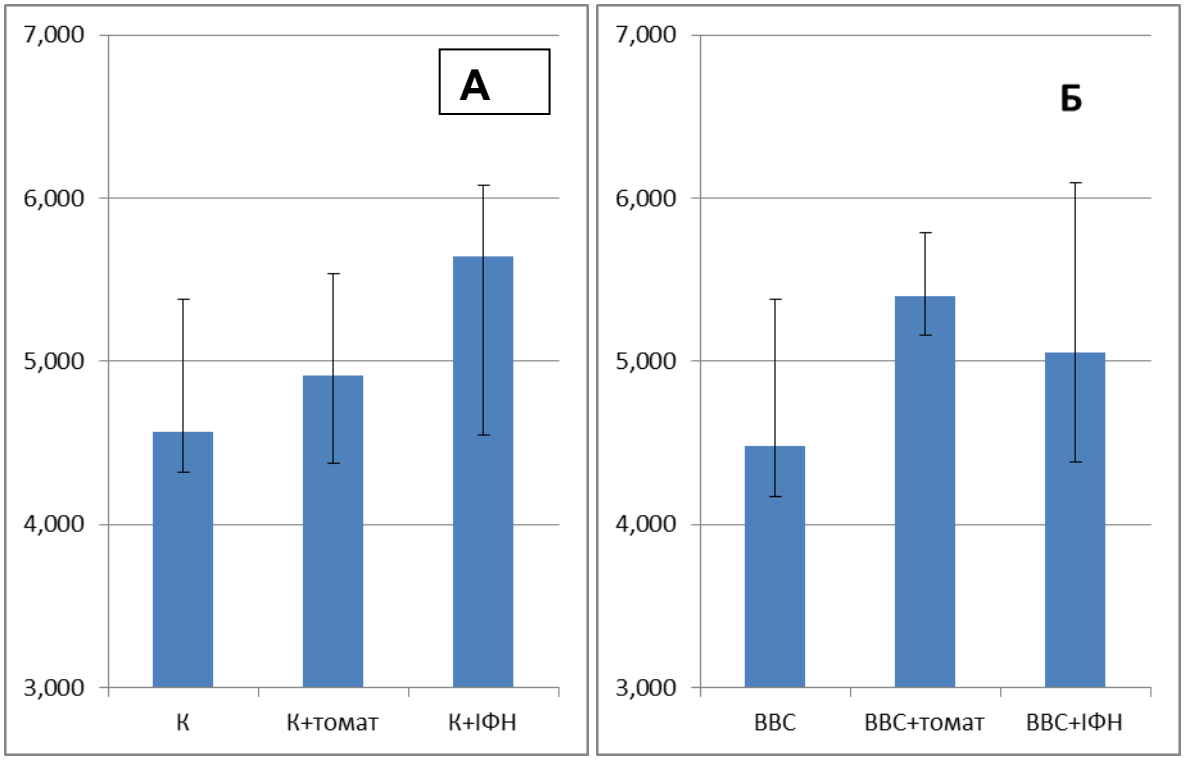


Рис. 5.6. Індекс маси селезінки (відношення маси селезінки до маси тіла) (А) у незаражених (К, К+томат, К+ІФН) та (Б) заражених (ВВС, ВВС+томат, ВВС+ІФН) груп мишей, яким згодовували чистий комбікорм (К, ВВС), комбікорм з додаванням томатів оригінального сорту Шедевр 1 (К+томат, ВВС+томат) або комбікорм з додаванням томатів сорту Шедевр 1, які експресують ген інтерферону людини (К+ІФН, ВВС+ІФН).

Хоча вважається, що активність інтерферону є видоспецифічною, людський IFNalpha був успішно випробуваний у ветеринарії для лікування імуноопосередкованого кератокон'юнктивіту [52] та ідіопатичної рецидивуючої поверхневої піодермії у собак [53], котів, природно-інфікованих вірусами FeLV (вірусом лейкозу котів) та FIV (вірусом імунодефіциту котів) [54], та проти вірусу вірусної діареї великої рогатої худоби [55]. Пероральна терапія поросят природним людським інтерфероном альфа змінювала природний перебіг та знижувала високу захворюваність та смертність, що зазвичай спостерігається при трансмісивному гастроентериті [56]. ІФН-альфа людини посилює системні захисні реакції у мишей, захищаючи від *Listeria monocytogenes* [57]. Дані

нашого експерименту по виживаності мишей після інфікування вірусом ВВС підтверджують позитивний вплив інтерферону людини на перебіг системного вірусного захворювання в іншого, неспорідненого виду.

Існують певні обмеження при синтезі інтерферону в інших експресійних системах, пов'язані з високими витратами та ризиком забрудненням патогенами людини і тварин [58, 59]. Тому рослини томатів, отримані в наших дослідженнях, мають певні переваги як продуценти інтерферону: смачні їстівні плоди без шкідливих вторинних метаболітів, високий вміст лікопіну, тривалий термін зберігання плодів, висока врожайність і тривала стабільність HuIFNα-2b у плодах, що зберігаються.

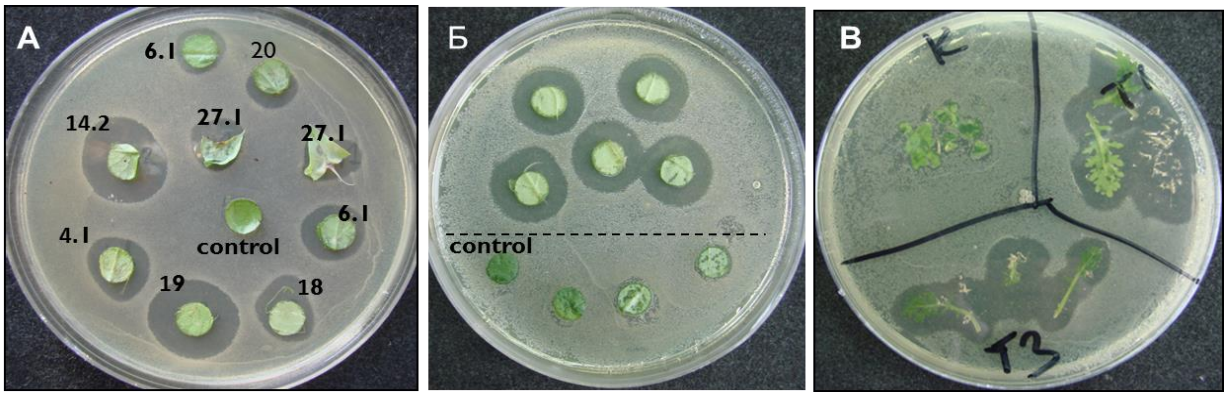
В роботі також було показано, що плоди томатів зберігали біологічну активність інтерферону щонайменше три місяці за умови зберігання при помірній кімнатній температурі, а накопичений інтерферон зберігає свою біологічну активність при висушуванні рослинного матеріалу. Було показано, що оромукозальний спосіб доставки інтерферону підвищував активність перитонеальних макрофагів та виживання мишей після інфікування вірусом. Отже, інтерферон людини HuIFNα-2b, синтезований в трансгенних рослинах томата проявляє біологічну активність не лише *in vitro* в модельній системі, якою є культура клітин мавпи, заражена вірусом, але й *in vivo* при зараженні живих мишей вірусом везикулярного стоматиту.

РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН, ЩО МІСТЯТЬ ГЕН КОЛІЦИНУ М.

Ефективно протидіяти розповсюдженню бактеріальних інфекцій при забрудненні патогенними мікроорганізмами харчових продуктів можна за допомогою бактеріоцинів – невеликих білків, які продукують бактерії, для знищення близькоспоріднених штамів при виникненні конкуренції за ресурси [5-7]. Рекомбінантні коліцини, отримані методом транзієнтної експресії в рослинах, були визнані Управлінням з контролю за продуктами і ліками США (FDA) як GRAS (безпечні для споживання) та дозволені для застосування в якості антибактеріальних засобів [60]. В нашій роботі ми демонструємо отримання коліцинів не тільки за рахунок транзієнтної (тимчасової) експресії відповідних генів, а в стабільно генетично трансформованих видах їстівних рослин – салаті, мізуні, моркві та ін. Незважаючи на те, що рекомбінантний білок в трансгенних рослинах зазвичай накопичується в менших кількостях у порівнянні з транзієнтною експресією, на нашу думку, такий підхід має свої переваги. Зважаючи на значну антибактеріальну активність цього білка, навіть невелика кількість бактеріоцинів, що накопичується в трансгенних рослинах, при додаванні в їжу або корм для тварин, здатна запобігти розмноженню патогенних штамів мікроорганізмів і убезпечити від спалахів гострих бактеріальних інфекцій.

Для визначення антибактеріальної активності в рослинних екстрактах та експлантат в роботі використовували *E. coli* штам XL1-Blue, що вирощували в рідкому середовищі LB (табл. 3.1) з додаванням 10 мг/л тетрацикліну на ротаційному шейкері (200 об./хв.) при температурі 37^0C протягом ночі. Для тестування антибактеріальної активності також використовували *E. coli* штам DH10B, який вирощували в таких же умовах, без додавання антибіотиків.

В роботі антибактеріальну активність отриманих трансгенних рослин визначали декількома способами. Для швидкого відбору трансгенних ліній з найбільшою антибактеріальною активністю використовували тест, в якому рослинні експланти розміщували на поверхні агаризованого середовища (LB з додаванням 10 мг/л тетрацикліну), по поверхні якого було розтерто агробактеріальну суспензію *E. coli* штам XL1-Blue (нічна культура у розведенні 1:1000). На чашку Петрі діаметром 10 см наносили 400 мкл отриманої бактеріальної суспензії, розтирали та підсушували в ламінарному боксі. На поверхню викладали експланти листків рослин діаметром 0,5 см (або просто листки, для рослин з посіченим листям, таких як морква та мізуна). Чашки Петрі культивували при температурі 37^0C протягом ночі. Результати експерименту представлені на рисунку 6.1.



6.1. Визначення антибактеріальної активності рекомбінантного коліцину М в експлантах трансгенних рослин проти *E. coli* штам XL1-Blue:

А – експланти трансгенних рослин салату;

Б – експланти відібраної лінії тютюну № 11 у порівнянні з контролем;

В – листки трансгенних ліній мізуни.

Після культивування при 37^0C протягом ночі на поверхні агаризованого середовища формувався суцільний бактеріальний шар і

чітко визначались «зони незаростання» навколо рослинних експлантів (рис. 6.1). Завдяки такому тесту ми швидко змогли відібрати трансгенні лінії, що демонстрували антибактеріальну активність та приблизно оцінити рівень експресії в різних трансгенних лініях. Необхідність такого попереднього тесту зумовлена тим, що в трансгенних рослинах часто можна спостерігати таке явище, як замовчування трансгенів [61-63], і навіть при наявності трансгену в геномі, відсутня його експресія, а отже і відповідний білок. Як видно на рисунку 6.1.-А, різні лінії салату демонструють різні по радіусу «зони незаростання» навколо експлантів. Тоді як експланти однієї – відібраної продуктивної лінії (рис. 6.1-Б) демонструють однаковий результат при проведенні такого тесту. В усіх представлених випадках контрольні рослини (нетрансгенні рослини того ж виду), позначені на рисунку літерою К, не пригнічують ріст бактерії взагалі і чітко відрізняються від трансгенних ліній.

Цей текст ми також використовували для швидкого визначення, чи не була втрачена антибактеріальна активність відібраних трансгенних ліній після довгого культивування рослин без дії селективного агента та в умовах теплиці. На рисунку 6.2. показано рослини моркви, які були висаджені в грунт на початку літнього сезону (А), та отримані в кінці сезону (рослини сформували коренеплоди), які росли 4 місяці в грунті без тиску селективного агенту. На рисунку 6.2.-В можна побачити, що антибактеріальна активність в рослинах збереглася і детектується також і в коренеплодах.

Рисунок 6.2. Антибактеріальна активність в черешках та коренеплодах трансгенної моркви, що вирощувалась в ґрунті: А-Б – трансгенна морква з геном коліцину М на початку (А) та в кінці (Б) літнього сезону (видно сформовані коренеплоди); В, Г – тест на антибактеріальну активність.

Для іншого способу детекції антибактеріальної активності використовували екстракти трансгенних рослин. 500 мг листків досліджуваних рослин розтерали в ступці з 0.05М TrisHCl (pH 8,0) у співвідношенні 1:1. Центрифугували 10хв при 14000 об/хв і використовували супернатант.

Розводили бактеріальну суспензію - 5мл середовища LB + 10 мкл нічної культури E.coli та 5мкл тетрацикліну на одну пробу (на 10 проб: 50мл LB +100мкл E.coli+50мкл тетрацикліну). До 5 мкл розведеної бактеріальної суспензії додавали по 250 мкл екстракту кожної трансгенної лінії з геном коліцину М. Як негативний контроль використовували 5мл LB + 250мкл екстракту нетрансгенної рослини.

Бактеріальну культуру нарощували на ротаційному шейкері (200 об./хв.) при температурі 37^0C протягом доби.і проводили вимірювання оптичної густини (OD^{600}) через певні проміжки часу протягом культивування. Пригнічення росту бактеріальної суспензії E. coli XL1-blue було показано при додаванні екстрактів трансгенних рослин моркви та броколі. Результати представлены на рис. 6.3.

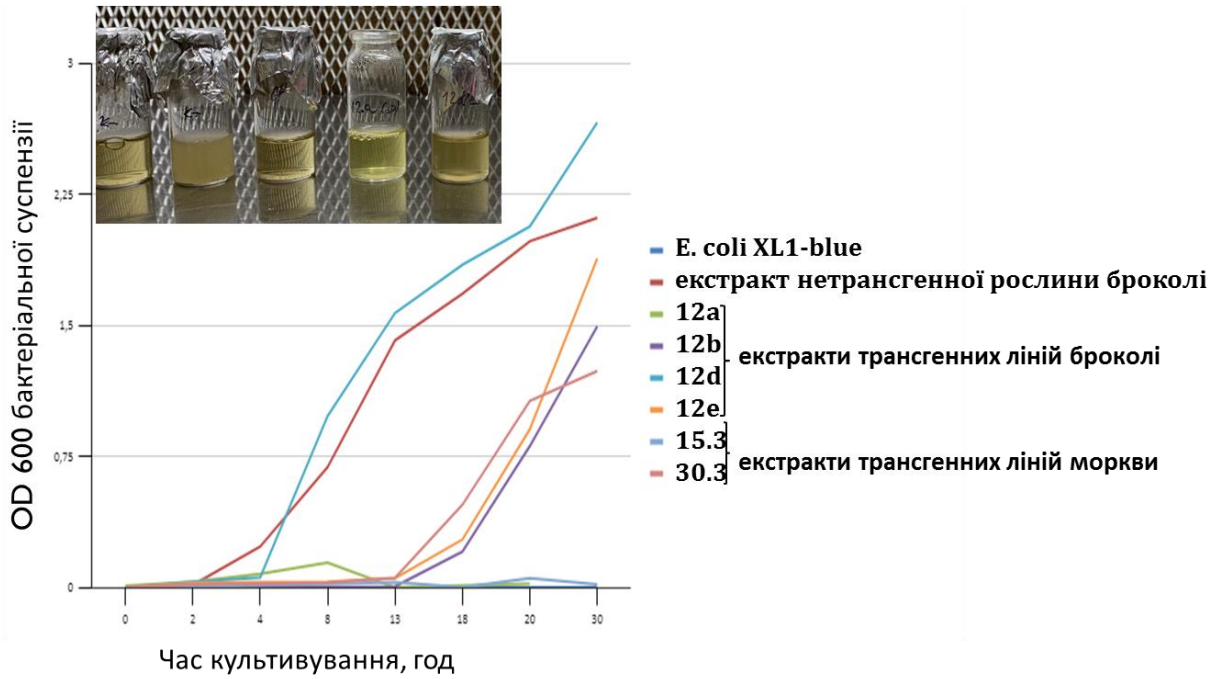


Рисунок 6.3. Пригнічення росту бактеріальної суспензії при додаванні екстрактів трансгенних рослин з геном коліцину М.

Як видно з рисунку 6.3., контрольні варіанти експерименту (бактерія без рослинного екстракту та бактерія з екстрактом нетрансгенної рослини) мають приблизно однакову динаміку росту. Тоді як додавання екстракту трансгенних рослин з геном коліцину М, дає суттєву затримку росту бактерії і оптична густина суспензії збільшується вже тільки після 12 годин культивуваня. Варто зауважити, що через 12 годин культивування зарастання може пояснюватись уже тим, що екстракти не були стерильні і через такий довгий час вже можуть розвинутись і інші бактерії. Тому на нашу думку, затримка росту на 12-14 годин чітко показує наявність

антибактеріальної активності субстратів.

Для чотирьох ліній трансгенних рослин броколі були подібні дослідження були проведені в трьох повторах та підтверджено пригнічення росту бактеріальної суспензії *E. coli* XL1-blue протягом 16 годин (Рис. 6.4.). Для цього експерименту ми використовували стерильні рослинні екстракти, щоб виключити можливість росту інших бактерій. Бактеріальна суспензія без додавання екстрактів трансгених рослин мала значно вищі показники OD^{600} вже через 4 години культивування. Три з чотирьох екстрактів трансгенних рослин повністю пригнічували ріст бактерії навіть після 16 годин культивування.

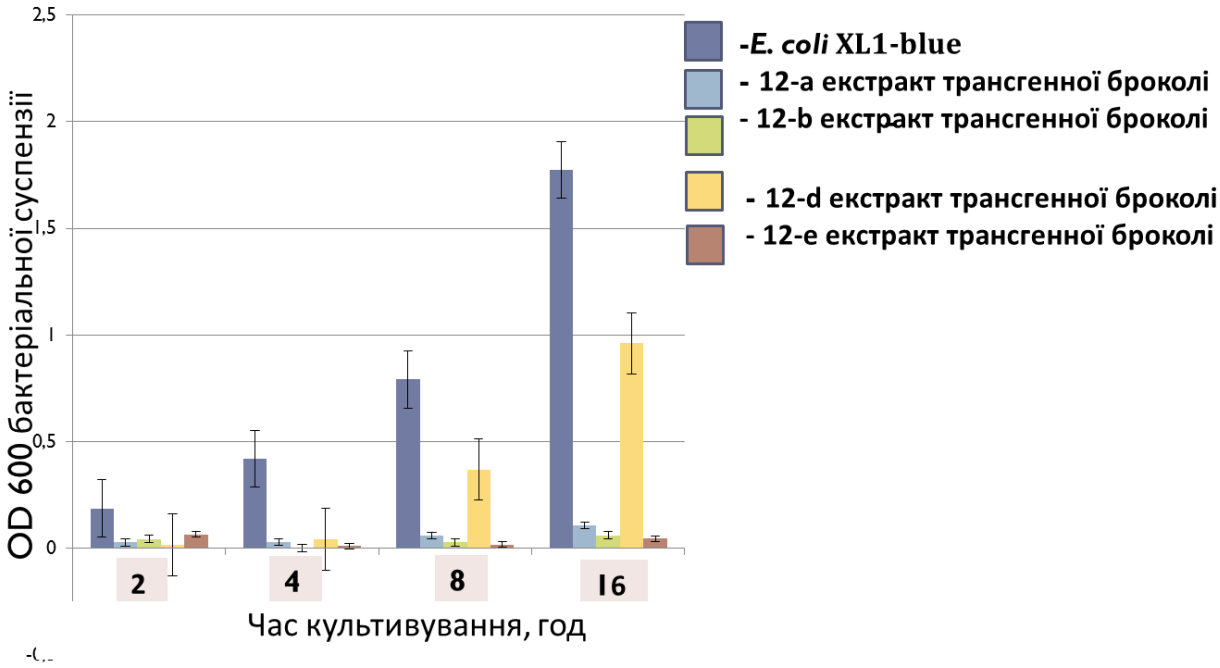


Рисунок 6.4. Пригнічення росту бактеріальної суспензії при додаванні екстрактів трансгенних рослин з геном коліцину М.

Для проведення цих експериментів був використаний прилад флуоресцентний рідер для мікропланшет FLUOstar® Omega, куплений за рахунок грантової підтримки цього проекту (рис. 6.5.)

Рисунок 6.5. Прилад, куплений за рахунок проекту, FLUOstar® Omega, флуоресцентний рідер для мікропланшет.

Антимікробну активність рекомбінантного коліцину М в рослинних екстрактах визначали в радіально-дифузійних аналізах методом нашарування напіврідкого агару з доданою бактеріальною суспензією *E.coli* штам DH10B. Для цього ми чашки з агаризованим середовищем LB, покривали середовищем з меншою кількістю агару, що містить клітини дослідженої E. coli. Наливали в чашки Петрі 15-20 мл агаризованого середовища LB (1,5% агару). LB м'яке агаризоване середовище (0,8% агару) розтопили, до аліквот по 20 мл (при 50-55°C) додавали нічну культуру E. coli (OD600-1,0) із співвідношенням 200 мкл бактеріальної культури на 20 мл середовища, що призводить до кінцевої OD600=0,01 або приблизно 1x107 клітин/мл. На утворену повехню наносили по 5 мкл екстракту підготовленого в різних розведеннях. Зразки екстрагували шляхом додавання 5 об’ємів буфера для екстракції (50 мМ HEPES pH7,0, 10 мМ ацетату K, 5 мМ ацетату Mg, 10% гліцерину, 0,05% Tween-20, 300 мМ NaCl) з наступною інкубацією протягом 30 хв на льоду, з подальшим центрифугуванням протягом 10 хв при 13000 об/хв при 4°C Надосадок перенесли в нову пробірку.

Для визначення антибактеріальної активності екстрактів

отриманих трансгенних рослин використовували метод нашарування напіврідкого агару з доданою бактеріальною суспензією *E.coli* штам DH10B. Перевірені розведення: нерозведені, 1:10, 1:100, далі 13 розведень 1:1,5 в екстракційному буфері. Результати цих досліджень представлено на рис. 6.6.

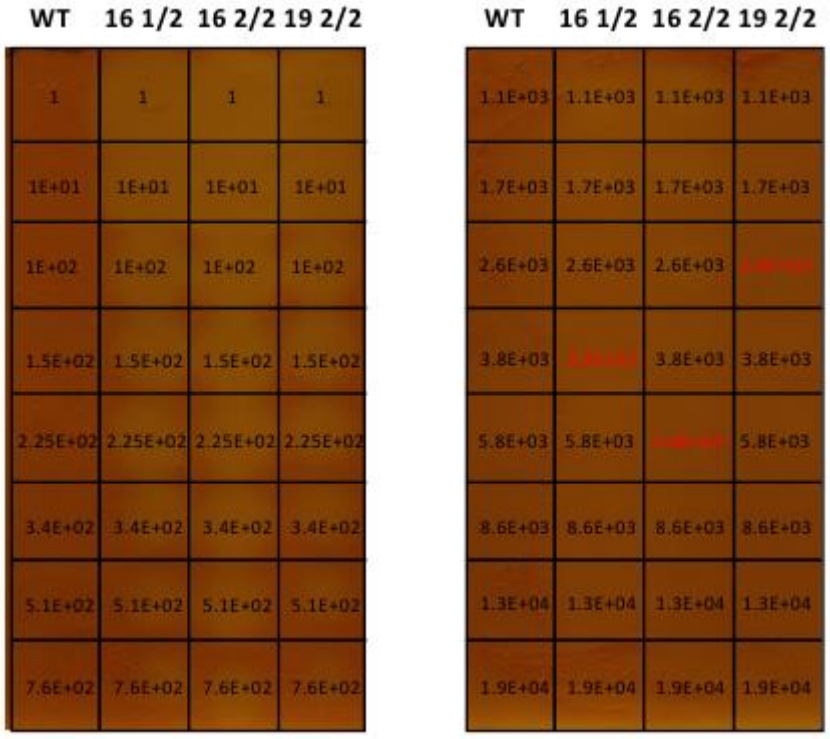


Рисунок 6.6. Результати визначення антибактеріальної активності екстрактів трансгенних рослин салату після проведення серії розведень.

Таблиця 6.1. Результати визначення антибактеріальної активності екстрактів трансгенних рослин салату.

	Концентрація білку мг/мл	**Активність УО**	**Специфічна активність УО/мг/мл**
Нетрансгенна рослина (Wt)	**1.68**	**0.00**	**0,00**
Лінія 16/1/2	**2.05**	**$3.80*10^3$**	**$1,85*10^3$**
Лінія 16/2/2	**2.42**	**$5.80*10^3$**	**$2.40*10^3$**
Лінія 19/2/2	**1.77**	**$2.60*10^3$**	**$1.47*10^3$**

Визначена антибактеріальна активність екстрактів, а також перерахунок цих значень на 1 мг білка в проаналізованих пробах представлено в таблиці 6.1. Визначення концентрації білку в рослинних екстрактах проводили по методу Бредфорда.

Також було проведено порівняння антибактеріальної активності висушених зразків трансгенних рослин салату, в яких проходить експресія антибактеріального білку коліцину М. Для проведення цих досліджень збирали по 6 листків кожної трансгенної лінії, висушували їх при 40^0С та проводили визначення антибактеріальної активності через 6, 30 та 90 днів зберігання. Результати представлені на рис. 6.7.

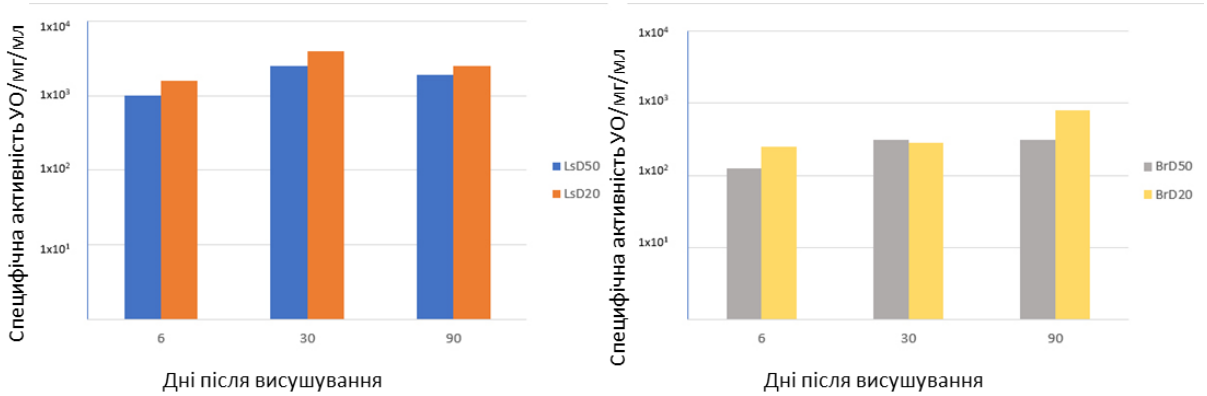


Рисунок 6.7. Результати визначення антибактеріальної активності екстрактів трансгенних рослин салату з геном коліцину через 6, 30 та 90 днів після висушування зразків.

Для отриманих трансгенних листових овочів (салат, мізуна, капуста кале) та коренеплодів (морква) була підтверджена антибактеріальна активність, що проявляється у припиненні росту різних штамів *Escherichia coli*. Накопичення рекомбінантного коліцину М в трансгенних рослинах салату становило біля 50 мкг на 1 мг сирої ваги, а антибактеріальна активність рослинних екстрактів становила в середньому $4*10^3$ УО. Для коліцину М було підтверджено збереження функціональної активності у висушеному рослинному матеріалі протягом 90 днів.

РОЗДІЛ 7. ОТРИМАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ З ГЕНОМ ІНТЕРФЕРОНУ *A2B* ЛЮДИНИ.

Трансгенні корені отримують внаслідок генетичної трансформації рослин за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*, яка є ґрунтовою бактерією, що викликає захворювання широкого кола дводольних рослин. Причиною виникнення хвороби у природних умовах є перенесення, стабільна інтеграція в геном рослини-господаря та експресія частини ДНК (Т-ДНК) онкоплазміди pRi бактерії *A. rhizogenes*. Для таких трансформованих коренів притаманні швидкий ріст і накопичення біомаси. Технологія їх культивування *in vitro* є маловитратною, адже трансформовані корені ростуть на середовищі без регуляторів росту, зі зменшеним вмістом макро- та мікроелементів, не вимагають освітлення та вирощуються у біореакторах [64]. Такі особливості привертають увагу до культури «бородатих» коренів як продуцентів ряду сполук, у тому числі таких, що мають лікувальні властивості. Отримані після трансформування агробактеріями і*n vitro* «бородаті» корені мають ряд специфічних рис: інтенсивний гормононезалежний ріст, відсутність позитивного геотропізму, високу ступінь галуження [65]. «Бородаті» корені накопичують вторинні метаболіти або запасні сполуки, властиві для того чи іншого виду рослин [66-68], причому вміст у них таких сполук може бути вищий за вміст в коренях нетрансформованих рослин. Культуру «бородатих» коренів вважають джерелом біологічно активних сполук.

Генетична трансформація за допомогою *A. rhizogenes* є зручним способом зміни рослинного геному через те, що бактерія може переносити не тільки власну Т-ДНК онкоплазміди pRi, а ще й Т-ДНК бінарних векторів із селективними та цільовими генами [69]. Використовуючи *A. rhizogenes* та «бородаті» корені, отримують не тільки сполуки, що синтезуються рослинами у природних умовах, а також рекомбінантні сполуки фармакологічного призначення.

До сполук, що можуть синтезуватися у клітинах рослин, належать інтерферони (ІФН). Інтерферони – білки і глікопротеїди хребетних тварин, які характеризуються високою неспецифічною противірусною активністю. Серед різних цитокінів ІФН виявляють найбільш широкий спектр біологічної активності, обумовленої їх природним призначенням захищати організм від різних патогенів: вірусів, бактерій, чужорідних клітин тощо. У організмі ссавців ІФН активно залучені в контроль імунної системи і клітинного гомеостазу: вони активують всі ланки специфічного і неспецифічного імунітету: активують природні кілери і макрофаги, стимулюють експресію антигенів гістосумісності і активують дендритні клітини, стимулюють проліферацію Т-клітин пам'яті і активність Т-клітинних ефекторів; стимулюють диференціювання і контролюють проліферативний потенціал клітин, обмежують вогнища запалення і пригнічують пухлинний ангіогенез.

7.1. Отримання культури трансгенних коренів пекінської капусти, що експресують ген інтерферону *α2b* людини

Пекінська капуста *Brassica rapa subsp. pekinensis* (Brassicaceae) – листовий різновид ріпи *Brassica rapa*, популярна овочева культура, що використовується в їжу переважно у свіжому та квашеному вигляді. Є цінним джерелом поліфенолів, флавоноїдів, аскорбінової кислоти та інших сполук з антиоксидантною активністю. Завдяки відсутності потенційно токсичних метаболітів, швидкому росту та значній біомасі, пекінська капуста приваблива також як рослина-біореактор для продукції в її клітинах рекомбінантних білків різного походження. Також, крім власне зелених частин рослини, джерелом біомаси можуть бути різні типи культур *in vitro*. Так, відомо, що культура бородатих коренів може використовуватись як джерело біомаси для продукції як цінних вторинних метаболітів, так і рекомбінантних білків [70]. Культура бородатих коренів

турнепсу – спорідненого до пекінської капусти виду рослин – виявилась більш ефективною для продукції принаймні одного з рекомбінантних білків (репортерного білку GFP), ніж подібна культура модельного виду *Nicotiana tabacum* [71]. Крім того, культура трансгенних коренів може бути використана для отримання шляхом прямого чи непрямого органогенезу трансгенних рослин з відповідним цільовим геном.

Вихідним рослинним матеріалом було насіння двох сортів пекінської капусти (Гранат та Мішель), придбане в торгівельній мережі. Насіння стерилізували 30% розчином комерційного препарату “Білизна” за загальноприйнятою методикою; проростки культивували на агаризованому середовищі МС зі зменшеним вдвічі вмістом макросолей та сахарози. Експлантами для генетичної трансформації були сегменти листків асептичних рослин. Для трансформації використовували бактерії *A. rhizogenes*, що несли плазміду з геном інтерферону людини *ifn-α2b* під контролем 35S промотору та селективний ген *nptII*, що надає трансформованим клітинам стійкості до канаміцину. Експланти 1-2 години витримували в суспензії бактерій, після чого культивували на безгормональному середовищі протягом 5-7 діб. Після цього експланти переносили на середовище, що містило 500 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерій, в подальшому – 100 мг/л канаміцину для селекції трансгенних коренів. Виділення тотальної ДНК з отриманих кореневих ліній проводили ЦТАБ методом. Для підтвердження наявності перенесеного гену інтерферону *ifn-α2b* в геномі отриманих коренів проводили молекулярно-біологічний аналіз за допомогою ПЛР.

Корені на листкових експлантах починали з’являтись на 7-10 добу після співкультивування з бактеріями. Корені, що активно росли на селективному середовищі, були відокремлені від експлантів і культивувались на середовищі того ж складу. Для подальшого аналізу було відібрано 6 канаміцин-стійких кореневих ліній. Вони характеризувались

швидкими темпами росту як на рідкому, так і на агаризованому поживному середовищі, що не містило фітогормонів, та активно галузились (Рис. 7.1.). Проведений аналіз за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними до гену інтерферону *ifn-α2b*, підтвердив, що всі шість кореневих ліній містять цільовий ген.

Рисунок 7.1. Культивування бородатих коренів пекінської капусти на рідкому безгормональному поживному середовищі

Було проведене визначення антивірусної активності екстрактів двох ліній коренів двох сортів пекінської капусти (Гранат та Мішель), причому використовувались як екстракти зі свіжих, так і з заморожених при -20^{0}С коренів. Антивірусну активність інтерферону визначали, як описано у розділі 5.1. Результати вимірювань подано у Таблиці 7.1. Встановлено, що трансгенні корені пекінської капусти сорту Гранат виявляють високу антивірусну активність, причому така активність не втрачається при зберіганні коренів при -20^{0}С.

Таблиця7.1. Активність інтерферону в бородатих коренях пекінської капусти сортів Гранат та Мішель

Сорт	Активність інтерферону	
	(МО на 1 мг білку)	(МО на 1 грам сирої ваги)
Мішель	3770	3536
Гранат (заморожені)	42020	43707
Гранат (свіжі)	34696	9168

Потенційно в подальшому їх можна буде використовувати і як безпосереднє джерело біомаси для отримання інтерферону, і як проміжну культуру при отриманні трансгенних рослин пекінської капусти, що здатні продукувати інтерферон.

7.2. Отримання та аналіз культури трансгенних коренів та рослин мангольду, що експресують ген інтерферону *α2b* людини.

Для генетичної трансформації використовували асептичні проростки (гіпокотилі та сім'ядольне листя) мангольду (*Beta vulgaris* L.) сортів «Ізумруд», «Міраж», «Алий», «Червоний», «Райдужний». Насіння стерилізували за загальноприйнятою методикою, занурюючи на 2 хвилини у 70%-ний розчин етанолу, на 20 хвилин – 10%-ний розчин сірчаної кислоти, надалі відмиваючи декілька разів по 4-5 хвилин стерильною дистильованою водою. Насіння пророщували на живильному середовищі з сольовою основою за Мурасіге-Скугом за температури 28˚С в темноті протягом 14-18 днів.

Суспензійну бактеріальну культуру *A. rhizogenes* та штам GV3101 *A. tumefaciens*, що містили один з векторів з геном інтерферону (рис. 1.7) осаджували центрифугуванням (5000 об/хв, 4˚С). Отриманий осад ресуспендували у розчині, що містив 1,65 г/л NH_4NO_3, 1,9 г/л KNO_3, 0,44

г/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,37 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,17 г/л KH_2PO_4, 0,1 г/л міоінозитолу, 20 г/л сахарози і 200 мкМ ацетосирінгону, та надалі культивували на ротаційному шейкері за температури 28˚С та 200 об/хв протягом години.

Перед проведенням генетичної трансформації гіпокотильні та сім'ядольні експланти асептичних проростків мангольду протягом двох тижнів культивували на твердому живильному середовищі МС зі зниженим вдвічі вмістом сахарози та додаванням 2 мг/л БАП для ініціації калусотворення. Після інкубування експлантів протягом 5-10 хв у отриманій бактеріальній суспензійній культурі, їх піддавали вакуум-інфільтрації і надалі промивали стерильною дистильованою водою. Генетична трансформація проходила на стерильному фільтрувальному папері протягом 48 годин на розсіяному світлі. В подальшому експланти переносили на агаризоване живильне середовище МС зі зниженим вдвічі вмістом сахарози, доповнене 2 мг/л БАП та 100 мг/л антибіотику канаміцинсульфату або 5 мг/л гербіциду фосфінотрицину в якості селективного агенту, 500 мг/л антибіотику цефотаксиму для елімінації бактерій, та культивували за температури 24˚С, 16-годинному фотоперіоді.

Через 4-5 тижнів первинні калусні клони переносили на живильне середовище MS з додаванням 1 мг/л БАП, 0,3 мг/л НОК, 0,4 мг/л ГК, тіосульфату срібла, 0,5 г/л ПВП, 0,1 г/л проліну для ініціації регенерації рослин мангольду для регенерації рослин культивували за температури 24˚С, 16-годинному фотоперіоді. Концентрацію селективного гербіциду фосфінотрицину збільшували до 10 мг/л, концентрацію антибіотику канаміцину не змінювали. Контрольні експланти, що не піддавали генетичній трансформації, не були здатні формувати калусні клони на живильному середовищі з додаванням селективних речовин у вказаних концентраціях. Перші рослини-регенеранти формувалися шляхом соматичного ембріогенезу через 3-4 місяці після перенесення на

регенераційне живильне середовище. Вдалося отримати до 3-4 рослин-регенерантів з одного калусного клону, але ми вважали їх за одну трансформаційну подію, враховуючи їх спільне походження. Регенеровані рослини пересаджували кожні два тижні та після укорінення переносили в умови ґрунту.

Отримані в нашому дослідженні трансгенні рослини мангольду отримані в результаті *A.rhizogenes*-опосередкованої трансформації мали фенотип, що за біометричними показниками не відрізнявся від контрольних рослин, які не піддавали генетичній трансформації, та від рослин, отриманих в результаті генетичної трансформації з використанням нопалінового штаму GV3101 *A. tumefaciens.* Експланти, оброблені агропіновим штамом A4 *A. rhizogenes* утворювали культуру «бородатих» коренів та, надалі, калусні клони на живильному середовищі МС з додаванням 2 мг/л БАП nf селективних речовин у вказаних концентраціях через 5-7 тижнів після інокулювання бактеріальною суспензійною культурою, а потім - і регенеранти на селективному середовищі МС для регенерації при 22-23ºС, 16-годинному фотоперіоді через 4-5 місяців після перенесення на регенераційне живильне середовище.

7.2.1. Аналіз трансгенних рослин та трансгенних коренів мангольду.

Молекулярно-біологічний аналіз методом ПЛР на виявлення *HuINF α-2b* гену людського лейкоцитарного інтерферону альфа дозволив підтвердити присутність цільового гену для 95% досліджуваних рослин та зразків культури «бородатих» коренів мангольду (Рис. 7.2.).

Ефективність трансформації розраховували як співвідношення кількості трансгенних рослин мангольду до кількості отриманих при генетичній трансформації канаміцин-стійких та фосфінотрицин-стійких рослин-регенерантів, що піддавали молекулярно-біологічному аналізові.

Достовірної різниці за показником ефективності генетичної трансформації для рослин, отриманих в результаті генетичної трансформації з використанням різних агробактеріальних штамів чи плазмідних векторних конструкцій (pNPB030, pCB 124, pCB 125) не спостерігали.

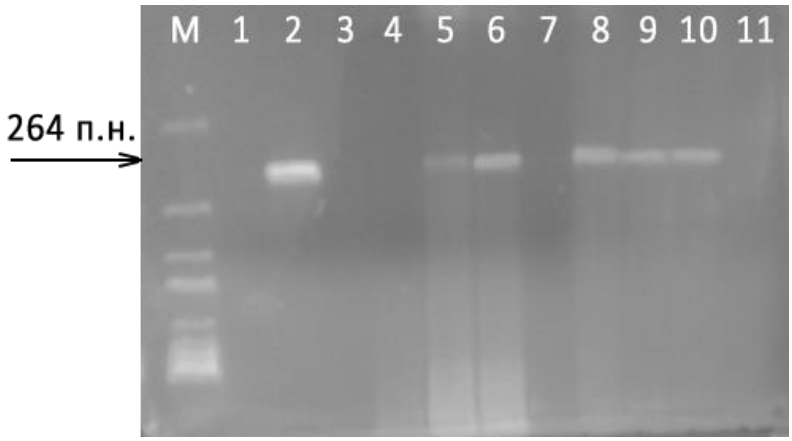


Рисунок. 7.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації на присутність *HuINFα-2b* гену у трансформованих рослинах мангольду: М – ДНК маркер (1 Kb Plus DNA Ladder, Fermentas), 2 – позитивний контроль (плазмідна ДНК pNPB030), 4 – негативний контроль (проба без ДНК), 5-10 – ДНК аналізованих трансформованих рослин, 11 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої рослини).

ПЛР-аналіз дозволив виявити присутність агробактеріального гену *rolB,* що підтверджує трансгенну природу отриманої кореневої культури для 95–98% аналізованих ліній культури „бородатих” коренів (рис. 7.3) мангольду, здатних експресувати ген людського інтерферону альфа та накопичувати рекомбінантний білок (згідно результатів аналізу екстрактів досліджуваних зразків на антивірусну активність).

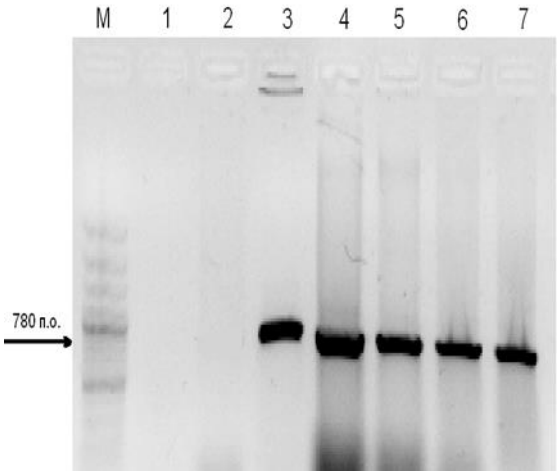


Рисунок. 7.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації на присутність на присутність *rolB* гену у зразках культури «бородатих» коренів: М – Маркер (1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas), 1 – негативний контроль (проба без ДНК), 2 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої рослини), 3 – позитивний контроль (плазмідна ДНК (А4)), 4-7 – ДНК аналізованих зразків культури „бородатих" коренів

З метою підтвердження транскрипції введених трансгенів методом ПЛР поєднаною зі зворотною транскрипцією вибірково аналізували 8 рослин, отриманих в результаті генетичної трансформації з використанням векторних конструкцій pNPB 030, що несла ген людського інтерферону альфа злитий *his-tag* послідовністю, і pCB 124 (рис. 7.4). Для всіх аналізованих рослин було підтверджено експресію гену рекомбінантного інтерферону.

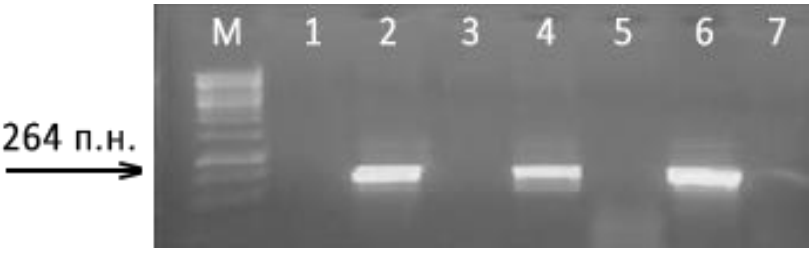
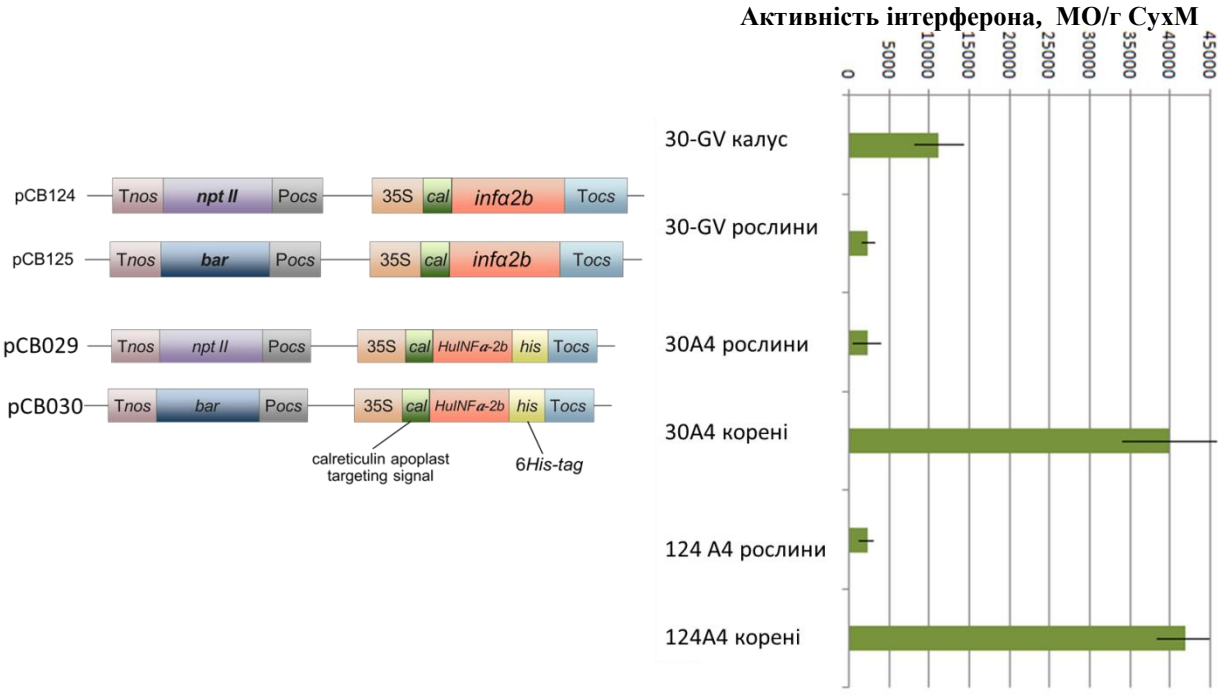


Рисунок. 7.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації пов'язаною зі зворотною транскрипцією з метою підтвердження експресії

гену інтерферону у зразках трансгенних рослинах мангольду: M – DNA marker ladder (1 Kb Plus DNA Ladder, Fermentas), 1 – негативний контроль (проба без ДНК), 2 – позитивний контроль (плазмідна ДНК pCB124), 4, 6 – кДНК аналізованих трансформованих рослин (реакція в присутності зворотньої транскриптази), 5, 7 – негативний контроль (реакційна суміш за відсутності зворотньої транскриптази).

В отриманих рослинах та трансгенних коренях мангольду антивірусну активність інтерферону визначали, як описано у розділі 5.1. Результати вимірювань представлені на діаграмі (Рис. 7.5. -Б).



А Б

Рисунок 7.5. А- схеми генетичних векторів та Б- антивірусна активність трансгенних рослин та трансгенних коренів мангольду, що містять ген інтерферону людини альфа 2b.

В результаті проведених експериментів з генетичної трансформації, були отримані як трансгенні корені, так і трансгенні рослини мангольду з геном інтерферону. Антивірусна активність в усіх трансгенних рослинах

мангольду була невисокою, тоді як трансгенні корені мангольду, отримані після трансформації векторами pCB124 та pCB30 показали високий рівень антивірусної активності.

7.4. Дослідження рослин цикорію з геном інтерферону-α2b, регенерованих з «бородатих» коренів.

Культивування «бородатих» коренів цикорію

У роботі використовували лінії «бородатих» коренів цикорію з колекції лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, які були отримані нами раніше [72]. Корені субкультивували на агаризованому живильному середовищу Мурасіге та Скуга [35] зі зменшеним удвічі вмістом макросолей при температурі +24° С та 16- годинному освітленні. Для проведення біохімічних досліджень корені вирощували протягом 4 тижнів, відділяли від середовища, промивали дистильованою водою та використовували відповідно до методик, наведених нижче.

Регенерація пагонів цикорію

Для отримання пагонів «бородаті» корені цикорію вирощували на агаризованому живильному середовищі МС зі зменшеним удвічі вмістом макросолей при температурі +24° С та 16- годинному освітленні. Регулятори росту до середовища не додавали. Пагони формувалися на коренях через 3-4 тижні. Їх відділяли та переносили у чашки Петрі з середовищам такого самого складу.

7.3.1. Молекулярно-біологічний аналіз «бородатих» коренів цикорію та регенерованих пагонів.

Дослідженням встановлено можливість отримання пагонів цикорію безпосередньо з «бородатих» коренів при їх культивуванні на живильному

середовищі без додавання регуляторів росту. При цьому калусна тканина не утворювалася. Пагони формувалися безпосередньо на коренях. Після їх відділення від коренів та перенесення на поверхню агаризованого живильного середовища того самого складу утворювалися корені.

Для підтвердження наявності у регенерованих пагонах перенесених при трансформації генів було проведено молекулярно-біологічний аналіз з праймерами, специфічними до гена *ifn-α2b*.

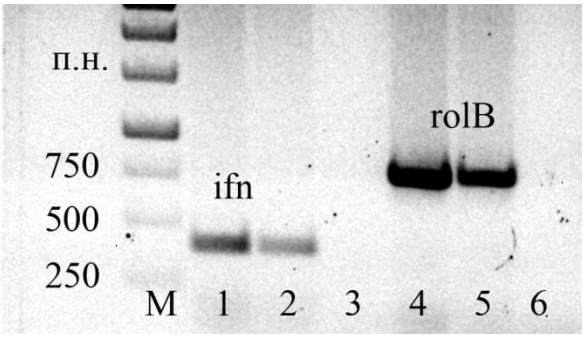


Рисунок. 7.6. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу загальної ДНК зразків з праймерами, специфічними до генів *rol*B та *ifn-α2b* (ж: М – маркер O`GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder #1163; 1, 2, 4, 5 – ДНК "бородатих" коренів; 3, 6 – ДНК контрольних рослин

Встановлено, що усі досліджувані рослини (загальна кількість 12) мали ген інтерферону *α2b* людини так само, як і вихідні «бородаті» корені, з яких пагони було регенеровано (рис. 7.6.). Крім того, рослини мали також ген *rol*B агробактерій, так само, як і вихідні «бородаті» корені.

7.3.2. Визначення загального вмісту флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активності в трансгенних коренях цикорію.

Аналіз підтвердив наявність флавоноїдів у екстрактах трансгенних рослин цикорію, отриманих з використанням 70% етанолу. При цьому виявлено деякі відмінності у загальному вмісті флавоноїдів у рослинах, регенерованих з різних ліній «бородатих» коренів. Так, вміст флавоноїдів коливався від 75.35 ±1.24 до 121.65±11.11 мг/г СМ (рис. 7.7).

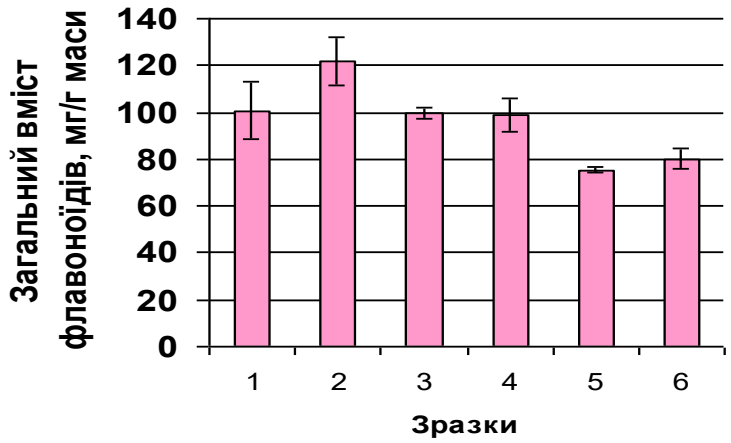


Рисунок. 7.7. Загальний вміст флавоноїдів у трансгенних рослинах цикорію, регенерованих з «бородатих» коренів

Аналіз здатності екстрактів з трансгенних рослин відновлювати DPPH радикал, проведений за параметром EC_{50} (еквівалентна концентрація, у даному випадку перерахунок на кількість рослинного матеріалу, яку необхідно внести до реакційної суміші для отримання 50% інгібування активності радикалу), встановив найбільшу активність у екстракті зі зразку №2 (рис. 7.8), що відповідає найбільшому вмісту флавоноїдів саме у цьому зразку. Найменша антиоксидантна активність спостерігалася у зразку №5, який характеризувався найменшим загальним вмістом флавоноїдів.

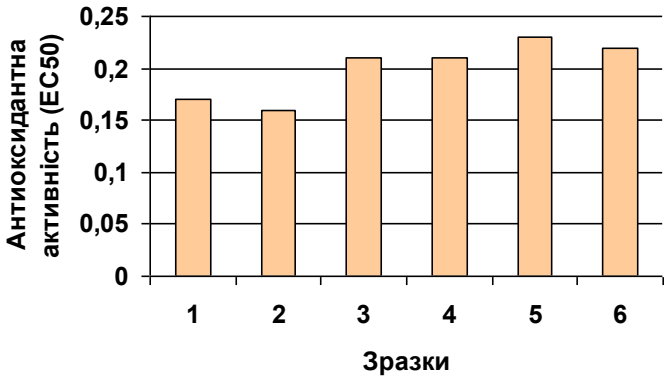


Рисунок 7.8. Антиоксидантна активність у екстрактах з трансгенних рослин цикорію, регенерованих з «бородатих» коренів

Аналіз відновлювальної активності етанольних екстрактів, у яких попередньо було визначено загальний вміст флавоноїдів, показав, що найбільшою активністю відзначався зразок №2 (з найбільшим вмістом флавоноїдів), а найменшою активністю – зразок № 5 (з найменшим вмістом флавоноїдів (рис. 7.9.).

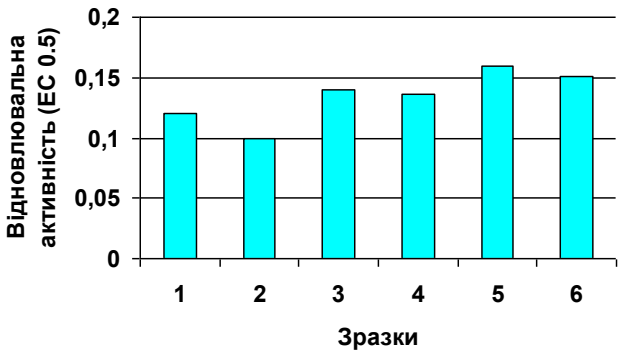


Рисунок 7.9. Відновлювальна активність у екстрактах з трансгенних рослин цикорію, регенерованих з «бородатих» коренів.

Таким чином, проведеними дослідженнями трансгенних коренів встановлено: можливість отримання трансгенних рослин шляхом прямої регенерації з «бородатих» коренів цикорію та мангольду з геном *ifn-α2b* людини; наявність у таких рослинах як гена *ifn-α2b*, так і *rol*B гена агробактерій; варіабельність у вмісті флавоноїдів у рослинах цикорію, регенерованих з різних трансгенних ліній коренів; наявність антиоксидантної та відновлювальної активності у регенерованих рослинах, причому рівень такої активності залежав від вмісту флавоноїдів. Крім того, була показано доволі високий рівень антивірусної активності у трансгенних коренях з геном інтерферону у таких культур як мангольд та пекінська капуста.

7.5. Дослідження трансгенних коренів алтею з геном інтерферону людини α2b.

Було проведено порівняння відкладеної відповіді різних ліній «бородатих» коренів *Althaea officinalis* L., що мають перенесений ген інтерферону-α2b, на дію короткотермінового холодового та високотемпературного стресу.

Різні лінії коренів алтеї відрізнялися за швидкістю росту за контрольних умов. Так, приріст маси коренів лінії №3 був найбільшим та становив 0.63±0.22 г за 5 тижнів. Найменший приріст спостерігали у коренів №4 – 0.17±0.07 г. Така значна різниця (у 3,7 рази) не пов'язана з відмінностями у векторі, використаному для трансформації, оскільки обидві вказані лінії отримано з використанням вектора pCB161, у якому ген *ifn-α2B* знаходився під контролем Mll промотора. Вірогідно, особливості росту різних ліній є результатом недетермінованого місця вбудовування перенесених генів і відповідного їх впливу на метаболізм клітин.

Вирощування при зниженій температурі не призводило до інгібування росту коренів. Приріст маси усіх зразків достовірно не відрізнявся від контрольних показників. Так, приріст маси коренів лінії №1 (pCB124) після дії зниженої температури становив 0.62±0.07 г, а за контрольних умов вирощування – 0.50±0.17 г. Відповідні показники для лінії №3 (pCB124) дорівнювали 0.73±0.04 г та 0.63±0.22 г, а лінії №5 – 0.48±0.03 г та 0.43±0.09 г. Таким чином, відносно короткий період зниження температури відкладено не призводив до пригнічення росту коренів усіх ліній незалежно від використаних для трансформування векторів. Це свідчить про досить широкий діапазон адаптивних можливостей «бородатих» коренів при дії зниженої температури.

Після вирощування протягом 7 діб при підвищеній температурі у більшості ліній коренів спостерігали пригнічення росту у чотирьох ліній «бородатих» коренів. Так, приріст маси коренів № 1, 2, 4 та 5 був меншим за приріст за контрольних умов у 2.37, 2.25, 5.61 та 13.42 рази відповідно (рис. 7.10). Разом з тим, корені №3 відрізнялись стійкістю до високої

температури, оскільки приріст маси у трьох варіантах експерименту (контроль, дія зниженої та підвищеної температури) не мав достовірних відмінностей та дорівнював відповідно 0.63±0.22 г, 0.73±0.04 г та 0.79±0.02 г.

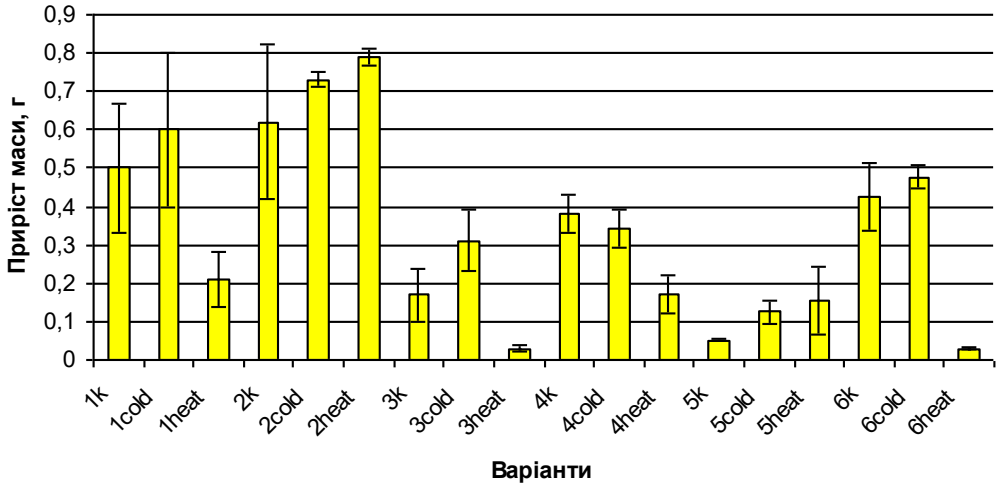


Рис. 7.10. Приріст маси «бородатих» коренів *Althaea officinalis* через 5 тижнів

Флавоноїди є вторинними метаболітами рослин, які характеризуються антиоксидантною активністю та завдяки цьому беруть участь у адаптації рослин до дії стресових чинників різного ґенезу. Нами було визначено особливості накопичення флавоноїдів у «бородатих» коренях алтеї, які вирощували за різних температурних умов. Дослідження показали наявність відмінностей у вмісті флавоноїдів у досліджуваних зразках навіть при їх вирощування за контрольних умов. Зокрема, найбільший вміст флавоноїдів виявлено у коренях № 3 – 2.07±0.64 мг/г ВМ RE (рис. 7.11). Короткочасне вирощування коренів при зниженій до +10°C температурі не призводило до змін у вміст флавоноїдів, причому такий ефект спостерігали в усіх лініях. Разом з там, відносно короткочасне підвищення температури у зразках № 1, 2, 4 та 5 привели до збільшення вмісту флавоноїдів у 1.16 – 2.86 рази. Випадала із загальної тенденції лінія №3, вміст флавоноїдів у якої був найбільшим та не змінювався за зміни умов культивування. Слід відмітити, що саме цей зразок також відрізнявся

і за параметром приросту маси, оскільки виявився нечутливим до дії зниженої та підвищеної температури

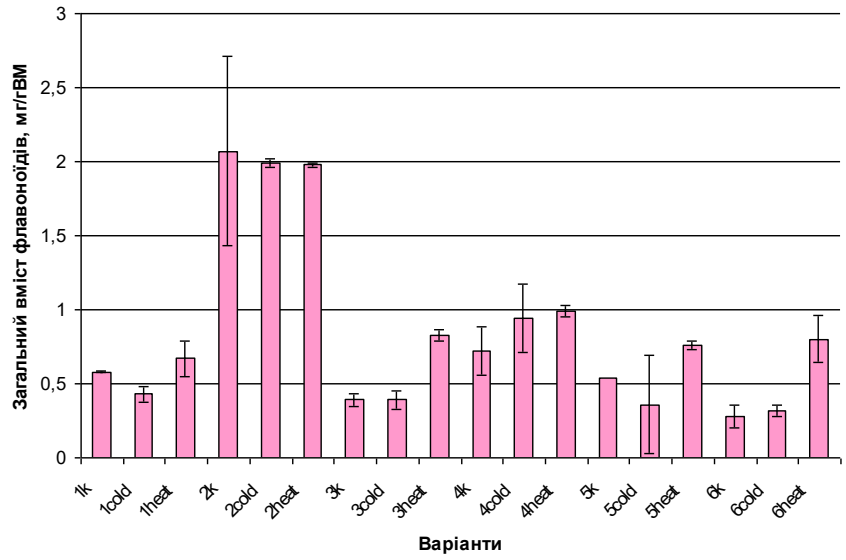


Рис. 7.11 – Загальний вміст флавоноїдів у «бородатих» коренів *Althaea officinalis* через 5 тижнів

Аналіз антиоксидантної активності (АОА) екстрактів з «бородатих» коренів виявив кореляцію між загальним вмістом флавоноїдів та цим параметром (рис. 7.12).

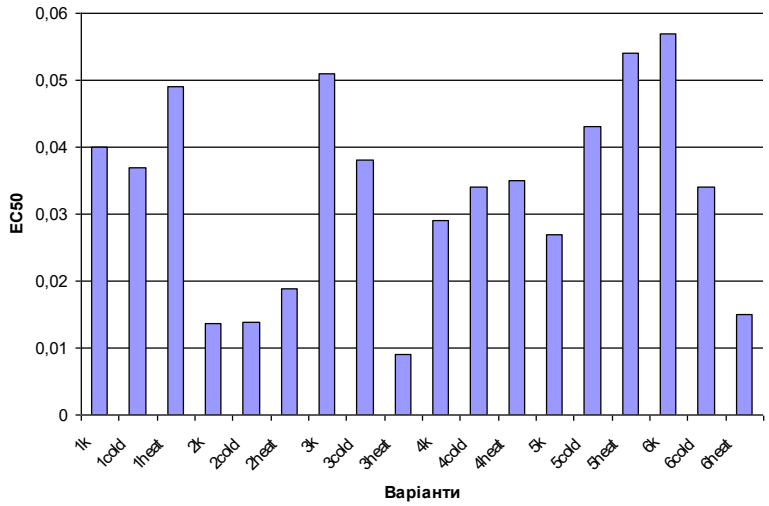


Рис. 7.12 – Рівень антиоксидантної активності «бородатих» коренів *Althaea officinalis* через 5 тижнів, визначений за здатністю відновлювати DPPH радикал (EC_{50}).

Так, зразки, що мали більший вміст флавоноїдів, характеризувалися і більшою антиоксидантною активністю. Наприклад, екстракти з коренів №3 мали найбільший вміст флавоноїдів у трьох варіантах експерименту (відповідно 2.07±0.64, 1.99±0.03 та 1.98±0.02 мг/г ВМ RE) та мали найбільшу антиоксидантну активність (EC_{50} 0.013, 0.013 та 0.018).

Отримані результати свідчать про те, що «бородаті» корені алтею різних ліній (окремі трансформаційні події) відрізняються за чутливістю до дії короткочасного температурного стресу, причому такі особливості не залежать від того, який саме ген або гени були перенесені. Висока температура є шкодочинною для «бородатих» коренів та призводить до значного гальмування росту. У той же час, короткочасне зниження температури не призводить до пригнічення росту коренів. Одночасно з інгібуванням росту при підвищенні температури спостерігається активізація синтезу флавоноїдів та підвищення антиоксидантної активності, вірогідно, як відповідь рослин на дії високої температури як стресового фактору. Таким чином, флавоноїди, очевидно, беруть участь у процесі відповіді та адаптації коренів до високотемпературного стресу. Корені, що мали найбільшу швидкість росту незалежно від наявності стресового фактору (зниженої чи підвищеної температури), синтезували також найбільшу кількість флавоноїдів, причому вміст цих сполук не змінювався при дії температурного стресу.

Отже, була показана можливість отримання трансгенних рослин цикорію та мангольду з геном *ifn-α2b* людини шляхом прямої регенерації з «бородатих» коренів. Були досліджені трансгенні корені алтею, пекінської капусти та мангольду з геном *ifn-α2b* людини, а також показана здатність до накопичення інтерферону та підтверджена антивірусна активність екстрактів трансгенних коренів пекінської капусти та мангольду.

РОЗДІЛ 8. СТАНДАРТИЗАЦІЯ УМОВ ОТРИМАННЯ БІЛКОВИХ РОСЛИННИХ ЕКСТРАКТІВ З ВИСОКИМ ВМІСТОМ ЦІЛЬОВИХ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ.

Одним із завдань Проекту була стандартизація умов отримання білкових рослинник екстрактів з високим вмістом цільового рекомбінантного білку. Для виконання цього завдання було використано різні рослинні об'єкти та застосовано хроматографічні методи з різним механізмом розділення. Зокрема, було використано розділення суміші білків з виокремленням фракцій, збагачених на цільовий рекомбінантний білок, з використанням двох типів хроматографічних смол – гельфільтраційної смоли Sephacryl-S-200HR (GE Healthcare, Sweden) та катіонобмінної смоли CaptoMMV (Cytiva, Sweden). Для розділення білкового екстракту використовували систему швидкої білкової хроматографії (FPLC) ÄKTAprime PLus (GE Healthcare, Sweden).

Для виділення фракції, збагаченої на інтерферон, використовували трансгенні рослини томатів сорту Шедевр, що несли та експресували ген людського інтерферону. Білковий екстракт листових пластинок готували за допомогою буфера Tris-HCl, pH 5, 50 мМ. Отриманий екстракт фільтрували через шар вати, центрифугували, отриману надосадову рідину при необхідності піддавали концентруванню, для чого його вміщували в діалізну трубку з MWCO 10 kDa (ThermoScientific, USA), котру зовні обсипали сухим Сефадексом 200 і залишали при температурі $+4^0$ С на 3-4 години. За цей час екстракт концентрувався в 3-4 рази. Для розділення екстракту за гельфільтраційним механізмом використовували скляну колонку, заповнену смолою Sephacryl-S-200HR (GE Healthcare, Sweden), висота стовпчика гелю становила 70 см. Сконцентрований екстракт наносили на колонку та промивали буфером такого ж складу, що й використовували для екстрагування, з швидкістю 0,5 мл/хвилину. Через 40

хвилин після завантаження екстракту почали збирати фракції, об’ємом 5 мл. Сумарно було зібрано 25 фракцій, котрі в подальшому було ліофілізовано, перерозчинено в невеликій кількості деіонізованої води (100-200 мкл) та використано для аналізу методом SDS-PAGE електрофорезу. Електрофорез проводили в 15% акриламідному гелі, забарвлення гелів здійснювали за допомогою розчину кумасі G-250. В результаті роботи визначено фракцію екстракту, збагачену на білок, приблизною масою 17-20 кДа, що відповідає шуканій масі інтерферону (19 кДа). У відповідній фракції екстракту нетрансгенних томатів смужки білку(ів) такого розміру майже не спостерігалось (Рис. 8.1).

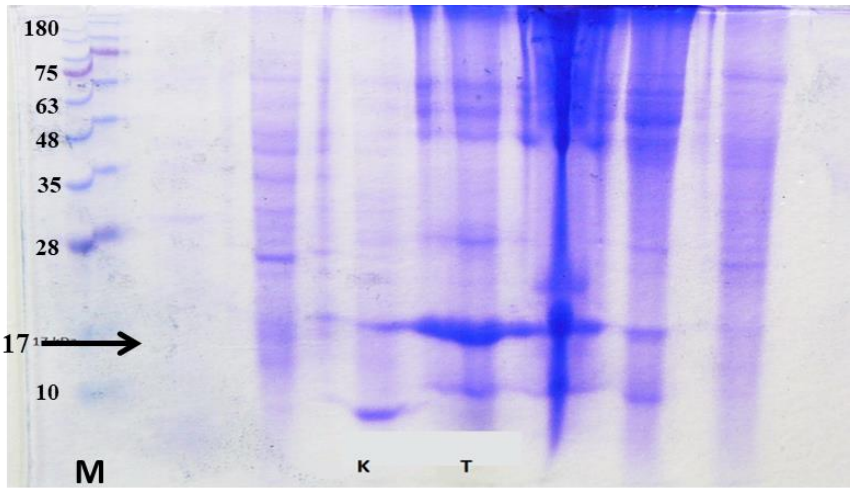


Рисунок 8.1. Електрофоретичне розділення фракцій білкових екстрактів листкових пластинок томатів, що експресують людський інтерферон; фракції екстракту: К – контрольних рослин, Т – трансгенних рослин, що продукують інтерферон; М – маркер молекулярної маси. Молекулярна маса інтерферону – 19 kDa.

Для екстрактів листкових пластинок томатів, що експресували людський інтерферон – як сконцентрованих, так і несконцентрованих, - досліджували також можливість їх розділення за допомогою смоли з

катіонобмінним механізмом розділення. Для цього використовували скляну колонку, заповнену смолою CaptoMMV (Cytiva, Sweden), висота стовпчика гелю - 14 см. Для відпрацювання методики розділення і більш надійного детектування фракції, що може містити експресований рослиною інтерферон, до рослинного екстракту додавали бактеріальний інтерферон (препарат Лаферон). Такий екстракт перед нанесенням на колонку підкислювали до pH 5, після чого фільтрували через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм. Для нанесення на колонку і первинного її промивання використовували буфер з РН 5, що містив 5мМ цитрату натрію та 50 мМ хлориду натрію. Первинне промивання здійснювали при швидкості потоку 1 мл/хвилину, протягом 20 хвилин, після чого колонку промивали буфером з pH 7 (20 мМ дигідрофіосфат натрію) для змивання слабозв'язаних білків. При цьому при початку промивання цим буфером починали збір фракцій по 3, а в подальшому - по 2 мл об'ємом. Для наступного етапу промивання використовували буфер з pH 9,7, котрий за розрахунками мав би змивати з колонки цільовий білок. В цілому було зібрано близько 40 фракцій, котрі ліофілізували , перерозчиняли в 30-100 мкл деіонізованої води і досліджували на наявність цільового білку за допомогою SDS-PAGE електрофорезу в 15% акриламідному гелі. В результаті роботи визначено фракцію екстракту, збагачену на білок, приблизною масою 17-20 кДа, що відповідає шуканій масі інетрферону (19 кДа). (Рис. 8.2.). В даному випадку це, ймовірно, бактеріальний інтерферон, що був доданий до рослинного екстракту перед розділенням. Проте дані результати розділення дали змогу визначити фракцію, в котрій міститься інтерферон, і, відповідно, встановити бажаний режим розділення екстрактів листкових пластинок томатів, використання котрого дозволить отримувати рекомбінантний інтерферон з генетично трансформованих томатів.

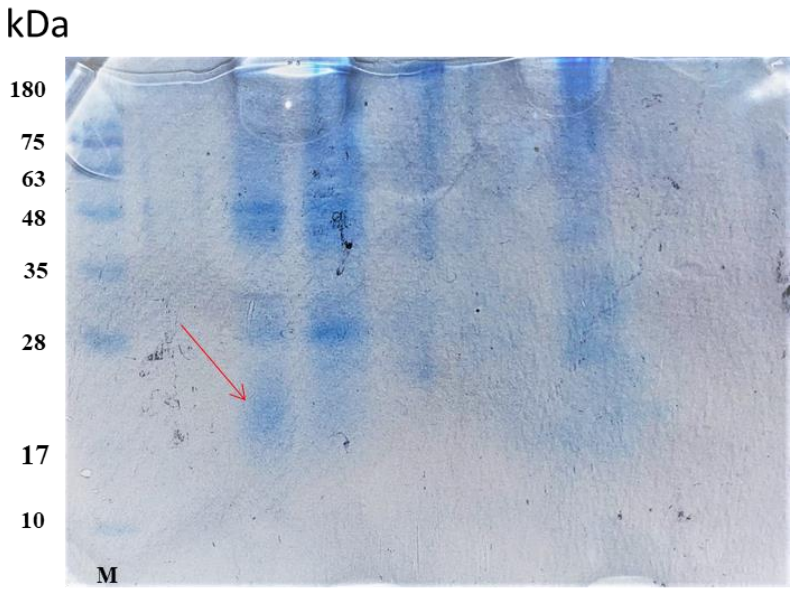


Рисунок 8.2. Електрофоретичне розділення фракцій білкових екстрактів листкових пластинок томатів, що експресують людський інтерферон та містять додатковий інтерферон, експресований за допомогою бактеріальних систем; М – маркер молекулярної маси. Червоною стрілкою позначено смужку білку(ів) розміром 17-20 кДа (молекулярна маса інтерферону – 19 kDa).

Подібний режим розділення було застосовано і для розробки методики очистки рекомбінантного коліцину з екстрактів рослин, що його продукують. Для таких досліджень було використано як стабільно трансформовані рослини (зокрема, асептичні генетично модифіковані рослини мізуни), так і рослини, в котрих накопичення коліцину відбувалось шляхом транзієнтної експресії (тютюни *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana rustica*). При розділенні екстракту листкових пластинок тютюну, що транзієнтно експресує коліцин, було встановлено фракцію екстракту, збагачену на цільовий рекомбінантний білок (Рис. 8.3).

Рисунок 8.3. Електрофоретичне розділення фракцій білкових екстрактів листкових пластинок тютюну *Nicotiana benthamiana*, що транзієнтно експресують коліцин; 1-9 - фракції екстракту; М – маркер молекулярної маси. Молекулярна маса коліцину – 29 kDa.

Тобто, в результаті даної частини роботи було розроблено методики отримання фракцій рослинних екстрактів, збагачених на досліджувані рекомбінантні білки: людський інтерферон альфа-2b (з використанням гель-фільтраційного та катіонобмінного механізму розділення) та коліцин М (з використанням катіонобмінного механізму розділення).

ВИСНОВКИ

1. Вперше були створені трансгенні рослини томату, в яких відбувається експресія антивірусного білку – інтерферону людини (HuIFNα-2b). В екстрактах листків трансгенних рослин томату сорту Шедевр біологічна активність була в сотні разів вищою, ніж для інших трансгенних рослин з геном інтерферону, і становила $850*10^3$ МО на 1 г сирої ваги.

2. Було підтверджено, що інтерферон людини HuIFNα-2b, синтезований в трансгенних рослинах томату, проявляв біологічну активність як *in vitro* в модельній системі (культура клітин мавпи, заражена вірусом), так і *in vivo* при зараженні живих мишей вірусом везикулярного стоматиту.

3. При виконанні проекту вперше були створені їстівні трансгенні рослини, в яких підтверджено експресію антибактеріального білку-бактеріоцину – коліцину М. Для отриманих трансгенних листових овочів (салат, мізуна, капуста кале) та коренеплодів (морква) була підтверджена антибактеріальна активність, що проявляється у припиненні росту різних штамів *Escherichia coli.*

4. Наявність рекомбінантного коліцину М в трансгенних рослинах салату та мізуни була підтверджена методом вестерн-блот. Накопичення рекомбінантного коліцину М в трансгенних рослинах салату становило приблизно 50 мкг на 1 мг сирої ваги, а антибактеріальна активність рослинних екстрактів становила в середньому $4*10^3$ УО.

5. Для однорічних видів з коротким вегетаційним періодом (салати, мізуна, томати) були отримані нащадки трансгенних рослин (F1), проведений аналіз та підтверджене успадкування трансгенів (гену коліцину М та інтерферону alpha-2b) та трансгенних ознак (антибактеріальної та антивірусної активності) у наступному поколінні рослин.

6. Було показано, що листки трансгенних рослин, в яких відбулось накопичення рекомбінантного фармацевтичного білку (коліцину М або інтерферону alpha-2b) зберігають свою антибактеріальну або антивірусну активність після висушування, що дає можливість використовувати порошок з висушених листків таких рослин як харчову добавку.

7. В роботі було розроблено методики отримання фракцій рослинних екстрактів, збагачених на досліджувані рекомбінантні білки: людський інтерферон альфа-2b (з використанням гель-фільтраційного та катіонобмінного механізмів розділення) та коліцин М (з використанням катіонобмінного механізму розділення).

8. Двома різними методами транзієнтної експресії в рослинах *N. benthamiana* та *N. rustica* був отриманий рекомбінантний коліцин М. Присутність в рослинних екстрактах рекомбінантного коліцину М була підтверджена за допомогою гель-електрофорезу білків в агарозному гелі та тесту на антибактеріальну активність. Обидва підходи є ефективними для отримання фармацевтичних рекомбінантних білків в рослинах, та мають свої особливості: метод з використанням культури *in vitro* дозволяє витримувати стандартизовані умови синтезу та концентрованого накопичення рекомбінантних фармацевтичних білків, тоді як метод з використанням рослин *N. rustica* дозволяє отримувати велику кількість рослинної біомаси, що містить біофармацевтичну продукцію.

9. Була показана можливість отримання трансгенних рослин цикорію та мангольду з геном *ifn-α2b* людини шляхом прямої регенерації з «бородатих» коренів. Були досліджені трансгенні корені алтею, пекінської капусти та мангольду з геном *ifn-α2b* людини, а також показана здатність до накопичення інтерферону та підтверджена антивірусна активність екстрактів трансгенних коренів пекінської капусти та мангольду.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kawaka F., Ngetich A. Plants as Expression Systems for Recombinant Proteins // Asian Journal of Biology. – 2017. – V. 3(3). – P. 1-8. https://doi.org/10.9734/AJOB/2017/34748
2. Burlakovskiy M.S., Yemelyanov L. A. Lutova Plant Based Bioreactors of Recombinant Cytokine // Appl. Biochem. Microbiol. – 2016. – V. 52(2) . – P. 121-137. doi: 10.1134/S0003683816020034
3. Zhou Q., Chen V., Shannon C.P. et al. Interferon-α2b Treatment for COVID-19 // Front. Immunol. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01061
4. Nidoieva Z.M., Peterson A.A., Ruban T.P. et al. The Influence of Recombinant Interferon α2b Synthesized in Plants on the Reparative Enzyme MGMT Expression in Human Somatic Cells in vitro // Cytol Genet. – 2019. – V. 53, № 6. – P. 467-472. DOI: 10.3103/S0095452719060070
5. Gabrielsen C., Brede D., Nes I.F. et al. Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action // Appl Environ Microbiol. – 2014. – V. 80(22). – P. 6854-6862. doi: 10.1128/AEM.02284-14
6. Kumariya R., Kumari Garsab A., Rajputc Y.S. et al. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria // Microbial Pathogenesis. – 2019. – V. 128. – P. 171-177. https://doi.org/10.1016/j.micpath
7. Benitez-Chao D.F., León-Buitimea A., Lerma-Escalera J.A. et al. Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by *in vivo* // Models. Front. Microbiol. – 2021. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630695
8. *E. coli* (*Escherichia coli*):outbreaks. URL: https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html (дата звернення: 09.12.2021)

9. Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G. et al. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? // Evol Appl. – 2015. – V. 8(3). – P. 240-247. DOI: 10.1111/eva.12185
10. Zhang S., Abbas M., Rehman M.U. et al. Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health // Sci Total Environ. – 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149280
11. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study // *Lancet Infect. Dis*. – 2016. – V. 16. – P. 161-168.
12. Paveenkittiporn W., Kamjumphol W., Ungcharoen R. et al. Whole-Genome Sequencing of Clinically Isolated Carbapenem-Resistant Enterobacterales Harboring *mcr* Genes in Thailand, 2016–2019 // Front Microbiol. – 2020. – 11: 586368. doi: 10.3389/fmicb.2020.586368
13. Schulz S., Stephan A., Hahn S. et al. Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – 112.40: E5454-E5460.
14. Schneider T., Hahn-Löbmann S., Stephan A. et al. Plant-made *Salmonella* bacteriocins salmocins for control of *Salmonella* pathovars // Scientific reports. – 2018. – V. 8.1. – 1-10.
15. Hahn-Löbmann S., Stephan A., Schulz S.et al. Colicins and Salmocins–new classes of plant-made non-antibiotic food antibacterials // Frontiers in plant science. – 2019. – V. 10. – 437.
16. Schillberg S., Zimmermann S., Voss A. et al. Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum* // Transgenic Res. – 1999. – V. 8. – P. 255-263.

17. Richter L.J., Thanavala Y., Arntzen C.J. et al.. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization // Nat Biotechnol. – 2000. – V. 18. – P. 1167-1171.
18. Streatfield S.J., Lane J.R., Brooks C.A. et al. Corn as a production system for human and animal vaccines // Vaccine. – 2003. – V. 21. – P. 812-815.
19. Sojikul P., Buehner N., Mason H.S. A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – V. 100. – P. 2209-2214.
20. Ko K., Tekoah Y., Rudd P.M., Harvey D.J. et al. Function and glycosylation of plantderived antiviral monoclonal antibody // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – V. 100. – P. 8013-8018.
21. Marillonnet S., Giritch A., Gils M. et al.]. *In planta* engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA moduls delivered by *Agrobacterium* // Proc Natl Acad Sci USA. – 2004. – V. 101 (18) . – P. 6852-6857.
22. Sheludko Y.V., Sindarovska Y.R., Gerasymenko I.M. et al. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression // Biotechnology and Bioengineering. – 2007. – V. 96. – P. 608-614.
23. Sindarovska Y.R., Olevinskaya Z.M., Demchenko O.A. et al. *Nicotiana cavicola* as a host for production of recombinant proteins by *Agrobacterium*-mediated transient gene expression // Biopolymers and Cell. – 2019. – V. 35 (5). - P. 340-348.
24. Mardanova E.S., Blokhina E.A., Tsybalova L.M et al. Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of potato virus X. // Front. Plant Sci. – 2017. – V. 8. – P. 247.

25. Shi X., Cordero T., Garrigues S. et al. Efficient production of antifungal proteins in plants using a new transient expression vector derived from tobacco mosaic virus // Plant Biotechnol J. – 2019. – V. 17(6). – P. 1069-1080.
26. Yamamoto T., Hoshikawa K., Ezura K. et al. Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. // Sci Rep. – 2018. – V. 8. – P. 4755.
27. Sindarovska Y.R., Gerasymenko I.M, Sheludko Y.V. et al. Production of human interferon alfa 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium*-mediated transient expression // Cytology and Genetics. – 2010. – V. 44(5). – P. 313-316.
28. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability // *PLoS One*. – 2008. – V. 3. – P. 3647.
29. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants // Curr Opinion in Biotechnol. – 2007. – V. 18 (2). – P. 134-141.
30. Shi X., Cordero T., Garrigues S. et al. Efficient production of antifungal proteins in plants using a new transient expression vector derived from tobacco mosaic virus // Plant Biotechnol J. – 2019. – V. 17 (6). – P. 1069-1080.
31. Дейнеко Е.В. Генетическая инженерия растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18, № 1. – С. 125-137.
32. Sirko A., Vaněk T., Góra-Sochacka A. et al. Recombinant cytokines from plants // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – 12. - P. 3536-3552. doi:10.3390/ijms12063536
33. Ma J.K-C., Drake P.M.W., Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants // Nature Reviews Genetics. – 2003. – V. 4. – P. 794-805.

34. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli // J. Bacteriol. – 1951. – V.62, № 3. – P. 293-300.
35. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plantarum. – 1962. – V.15, № 3. - P. 473-497.
36. Армитидж Ф. Выделение тотальных препаратов нуклеиновых кислот из *A. tumefaciens* / Ф. Армитидж, Р. Уолден, Дж. Дрейпер // Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ./ Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скота, Ф. Армитидж, Р. Уолден. – М.: Мир. - 1991. - С. 76-78. ISBN 5-03-0011854-9
37. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.) / J. Sambrook, E. F. Fritch, T. Maniatis. - New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. - ISBN 0-87969-309-6.
38. Ali A., Muzaffar A., Awan MF. et al. Genetically Modified Foods: Engineered tomato with extra advantages // Adv. Life Sci. – 2014. – V. 1 (3). – P. 139-152.
39. Roychoudhury A. Edible Vaccines and Oral Immunization against Viruses: Prospects, Promises and Pitfalls // SF J Med Res. – 2020. – V. 1 (3). – P. 1012.
40. Kwon K.C., Daniell H. Oral Delivery of Protein Drugs Bioencapsulated in Plant Cells // Mol Ther. – 2016. – V. 24 (8). – P. 1342-1350. doi:10.1038/mt.2016.115
41. Arlen P.A., Falconer R., Cherukumilli S. et al. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-α2b // Plant Biotechnology Journal. – 2007. – V. 5. – P. 511-525. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00258.x

42. Masumura T., Morita S., Miki Y. et al. Production of biologically active human interferon-α in transgenic rice // Plant Biotechnology. – 2006. – V. 23. – P. 91-97.
43. Патент lemna patent WO 2002010414A2 https://patents.google.com/patent/WO2002010414A2/zh)
44. Luchakivskaya Y., Kishchenko O., Gerasymenko I. et al. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // Plant Cell Rep. – 2011. – V. 30. – P. 407-415. DOI 10.1007/s00299-010-0942-5
45. Lowther W., Lorick K., Lawrence S.D. et al. Expression of biologically active human interferon alpha 2 in *Aloe vera* // Transgenic Res. – 2012. – V. 21. – P. 1349-1357. https://doi.org/10.1007/s11248-012-9616-0
46. Matvieieva N.A., Shakhovskiĭ A.M., Kuchuk N.V. Features of lettuce transgenic plants with the Ifn-a2b gene regenerated after *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation // Cytology and Genetics. – 2012. – V. 46 (3). – P. 150-154. doi:10.3103/s0095452712030073
47. Ohya K., Matsumura T., Ohashi K. et al. Expression of two subtypes of human IFN-alpha in transgenic potato plants // J Interferon Cytokine Res. – 2001. – V. 21. – P. 595-602.
48. Sakhno L.O., Kvasko O.Y., Olevinska Z.M. et al. Creation of transgenic *Brassica napus* L. plants expressing human *alpha-2b* interferon gene // Cytol. Genet. – 2012. – V. 46. – P. 342-346. https://doi.org/10.3103/S0095452712060096
49. Borisjuk N., Sitailo L., Adler K. et al. Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution // Planta. – 1998. – V. 206 (4). – P. 504-514. doi: 10.1007/s004250050427. PMID: 9821685

50. Borisjuk N., Borisjuk L., Logendra S. et al. Production of recombinant proteins in plant root exudates // Nature Biotechnology. – 1999. – V. 17. – P. 466-469. 10.1038/8643
51. Kopeliovitch E., Mizrahi Y., Rabinowitch H. D. et al. Physiology of the tomato mutant *alcobaca* // Physiologia Plantarum. – 1980. – V. 48 (2). – P. 307-311. doi:10.1111/j.1399-3054.1980.tb03260.x
52. Gilger B.C., Rose P.D., Davidson M.G. et al. Low-dose oral administration of interferon-alpha for the treatment of immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs. Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research // 1999. – V. 19 (8). – P. 901-905. https://doi.org/10.1089/107999099313433
53. Thompson L.A., Grieshaber T.L., Glickman L. et al. Human recombinant interferon alpha-2b for management of idiopathic recurrent superficial pyoderma in dogs: A pilot study // Vet. Ther. – 2004. – V. 5. – P. 75-81.
54. Gomez-Lucia E., Collado V.M., Miró G. et al. Follow-up of viral parameters in FeLV- or FIV-naturally infected cats treated orally with low doses of human interferon alpha // *Viruses*. – 2019. – V. 11 (9). – P. 845. https://doi.org/10.3390/v11090845
55. Elsheikh A.A., Braun L.J., Mansour S.M.G. et al. The effect of human interferon alpha on replication of different bovine viral diarrhea virus strains // Acta Virol. – 2019. – V. 63 (3). – 261-269. doi: 10.4149/av_2019_303
56. Cummins J.M., Hutcheson D.P., Georgiades J.A. et al. Oral therapy with human interferon alpha in calves experimentally injected with infectious bovine rhino-tracheites virus // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 1993. – V. 41. – P. 193-198.
57. Ohya K., Itchoda N., Ohashi K. et al. Journal of Interferon & Cytokine Research. – 2005. – P. 459-466. http://doi.org/10.1089/jir.2005.25.459

58. Sirko A., Vaněk T., Góra-Sochacka A. et al. Recombinant cytokines from plants // Int. J. Mol. Sci. – **2011**. – V. 12. – P. 3536-3552. doi:10.3390/ijms12063536
59. Buyel J.F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents // Biotechnology Advances. – 2018. – V. 36. – P. 506-520. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.02.002
60. Schulz S., Stephan A., Hahn S., Bortesi L. et al. Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of Escherichia coli by mixtures of plant-produced colicins. – Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – v. 112 (40). – P. 5454-5460.
61. Matzke M. A. Homology-dependent gene silencing and host defense in plants / M. A. Matzke, W. Aufsatz, T. Kanno [et al.] // Adv. Genet. – 2002. – V. 46. – P. 235-275.
62. Baulcombe D. RNA silensing in plants / D. Baulcombe // Nature. – 2004. – V.431, № 7006. - P. 356–363.Ratcliff F. G. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses / F. G.
63. Ratcliff, S. A. MacFarlane, D. C. Baulcombe // The Plant Cell. – 1999. - V. 11, № 7. - P. 1207–1215
64. Huang T.K., McDonald K.A. Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures // Biotechnol Adv. – 2012. – V. 30, № 2. – P. 398-409.
65. Giri A., Narasu M. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // Biotechnol. Adv. – 2000. – V. 18, № 1. – P. 1-22.
66. Chashmi N.A., Sharifi M., Karimi F. et al. Differential production of tropane alkaloids in hairy roots and in vitro cultured two accessions of *Atropa belladonna* L. under nitrate treatments // Z. Naturforsch. – 2010. – V. 65, № 5-6. – P. 373-379.

67. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N. Engineering high yields of secondary metabolites in *Rubia* cell cultures through transformation with rol genes // Meth. Mol. Biol. – 2010. – V. 643, №1. – P. 229-242.
68. Wang C.T., Liu H., Gao X.S. et al. Overexpression of G10H and ORCA3 in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves catharanthine production // Plant Cell Rep. – 2010. – V. 29, № 8. – P. 887-894.
69. Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L. et al. A simple and general method for transferring genes into plants // Science. – 1985. – V. 227, № 4691. – P. 1229-1231.
70. Georgiev M.I., Agostini E., Ludwig-Müller J. et al. Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource // Trends Biotechnol. – 2012. – V. 30. – P.528-537. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.001
71. Huet Y., Ele Ekouna J.P., Caron A. et al. Production and secretion of a heterologous protein by turnip hairy roots with superiority over tobacco hairy roots // Biotechnol. Lett. – 2014. – V. 36. – P. 181-190. https://doi.org/10.1007/s10529-013-1335-y
72. Матвєєва Н. А., Кіщенко О. М, Шаховський А.М., Кучук М.В. Синтез інуліну в «бородатих коренях» цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* // біотехнологія, - 2011 - Т. 4, №3, с. 56-63.