

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук
Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – бакалавр

на тему «**ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА *gfp* У РОСЛИНАХ
ВИДУ *Nicotiana rustica***»

Виконала: студентка 4–го року навчання
спеціальність 091 — біологія
Сайчук Анастасія Віталіївна

Керівники:
Симоненко Ю. В.,
кандидат біологічних наук,
науковий співробітник інституту
клітинної біології та генетичної
інженерії НАН України;
Шпильчин В.В.,
кандидат біологічних наук,
ст. викладач кафедри біології НаУКМА

Рецензент:
Банникова М.О.
кандидат біологічних наук,
ст. науковий співробітник інституту
генетичної інженерії НАН України;

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пасічник Т.В.
« » червня 2020 року

Київ 2020

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Системи експресії рекомбінантних ДНК.....	7
1.1.1 Вірусні векторні системи.	8
1.2. Транз'єнтна експресія опосередкована <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
1.3. Флуоресцентні білки та їх використання в генній інженерії.....	14
1.4. Рекомбінантні білки у рослинних системах.	16
1.4.1 Рекомбінантні білки у рослин роду <i>Nicotiana</i>	17
1.4.1.1. Рекомбінантні білки у рослин виду <i>Nicotiana rustica</i>	19
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	20
2.1. Характеристика об'єкту дослідження	20
2.2. Реактиви, матеріали та обладнання	20
2.2.1 Реактиви.	20
2.2.2. Характеристик векторних конструкцій.	20
2.2.3. Обладнання. Під час виконання роботи використовували таке обладнання	21
2.3. Методи.....	21
2.3.1. Методи, використані для вирощування рослин виду <i>Nicotiana rustica</i> . 21	
2.3.2 Методи, використані для культивування <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.3.3 Методи, використані для інфільтрування рослин виду <i>Nicotiana rustica</i>	22
2.3.4 Методи, використані для вимірювання експресії гена <i>gfp in vivo</i>	22
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	25
3.1. Порівняння видів <i>N. tabacum</i> , <i>N. bentamiana</i> та <i>N. rustica</i> на основі біометричних показників.....	25
3.2. Порівняння ефективності функціонування плазмід.....	26
3.3. Вплив інгібітора сайленсingu Р19 на рівень експресії гена <i>gfp</i>	30
3.4. Вплив фізіологічного стану листків на рівень експресії гена <i>gfp</i>	31

3.5. Вплив концентрації агробактеріальної суспензії на рівень експресії гена <i>gfp</i>	34
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	37
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	40

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

mРНК – матрична рибоннуклеїнова кислота

РНК – рибоннуклеїнова кислота

УФ – ультрафіолет

Т-ДНК – транспортна дезоксирибоннуклеїнова кислота

BFP – Blue Fluorescent Protein

CaMV – Cauliflower Mosaic Virus

CP – Coat Protein

dpi – day post-infiltration

ELISA – Enzyme Linked Immunsorbent Analysis

GFP – Green Fluorescent Protein

LB – Lysogeny Broth

NosT – Nopaline synthase Terminator

PVX – Potato Virus X

RdRP – RNA-depend RNA Polymerase

rhIFN – recombinant human Interferon

RT-PCR – Real Time Polymerase Chain Reaction

TMV – Tobacco Mosaic Virus

TuMV – Turnip Mosaic Virus

UTR – Untranslated Region

ВСТУП

Рослини можуть служити перспективною платформою для виробництва рекомбінантних білків, включаючи біофармацевтичні препарати. Існують дві основні біотехнології для експресії трансгенів у рослинах: це стабільна трансформація та транзйентна експресія генів. Створення стабільних трансформантів забирає багато часу через тривалі періоди культивування культур клітин та регенерації. Крім того використання ГМО культур не завжди сприймається громадськістю, що також стає однією з головних проблем. Саме тому необхідна нова технологія для виробництва біофармацевтичних препаратів. Транзйентна експресія генів вірусними векторами дозволяє швидко та у великих кількостях виробляти рекомбінантні білки в тканинах рослин [1], оскільки не потребує тривалого процесу скринінгу генів [2,3]. Доведено, що транзйентна експресія дає більш високі рівні експресії білка в рослинах, ніж трансгенні рослини.

Транзйентна експресія чужорідних генів у рослинах опосередковується шляхом інфільтрації тканин за допомогою суспензії *Agrobacterium tumefaciens* або векторів на основі геномів різних рослинних вірусів. Крім того, вірусні вектори також можуть бути інтегровані у бінарні вектори [4]. Створюючи та удосконалюючи вже наявні векторні системи можна значно підвищити рівні експресії генів та покращити стабільність. Удосконалення векторних систем може відбуватись багатьма способами, до яких належать зміна промотора [5,6], введення 5'UTR послідовності, використання двох термінаторів [7] та інгібітора посттранскрипційного сайленсингу генів [8].

Перевірку функціонування вірусної векторної системи інтегрованої у T-плазмиду *Agrobacterium tumefaciens* можна здійснювати використовуючи репортерний ген, оскільки його експресія надає організму чітко виражених та легко вимірюваних ознак. В якості репортерного білка часто використовується β -глюкуронідаза. Однак, останнім часом виправданим є використання репортерного білка GFP, оскільки його виявлення не потребує додаткових

біохімічних тестів. При опроміненні білка GFP ультрафіолетом він випромінює світло в діапазоні 500-510 нм [9–11].

Метою даної роботи є дослідження ефективності різних векторних конструкцій на основі вірусних та транскрипційних систем. Для досягнення мети було виконано ряд завдань:

1. Порівняти *Nicotiana rustica* з іншими представниками цього ж роду на основі біометричних показників;
2. Визначити рівень експресії гена інтересу на основі вимірів флуоресценції білка GFP;
3. Проаналізувати вплив інгібітора посттранскрипційного сайленсингу генів p19 на рівень експресії гена *gfp*;
4. Виявити вплив фізіологічного стану, концентрації введеної агробактеріальної суспензії та часу на рівень експресії гена *gfp*.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Системи експресії рекомбінантних ДНК

Системи експресії на основі рослин забезпечують альтернативну платформу біовиробництва для рекомбінантних білків з потенційними перевагами в економічності та масштабованості [2,3,12]. Розвиток системи зворотної транскрипції і методів маніпулювання геномом вірусів відкрили нові можливості для досліджень, спрямованих на вивчення потенціалу вірусів рослин, як векторів [13]. Перш за все, для експресії рекомбінантних білків для експресії генів інтересу у рослинних тканинах для розробки вакцин та інших біофармацевтичних препаратів. Поєднання агроінфільтрації та векторів на основі вірусів рослин забезпечує швидку експресію та збільшує накопичення в рекомбінантних білків у рослинах [3].

Для посилення експресії транскрипції у рослинних клітинах дуже важливий вибір промотору, який може оптимально взаємодіяти з транскрипційними факторами. Дуже часто використовуються екзогенні промотори у векторних системах. Наприклад, широко застосовується конститутивний промотор мозаїки цвітної капусти (CaMV) 35S, що сумісний з рослинними системами та зазвичай використовується для виготовлення експресійної касети, хоча її активність може знижуватися в деяких тканинах і клітинах [14].

Окрім підбору промотора існує також багато інших способів удосконалити векторні конструкції. Недавні дослідження показали, що 5'-UTR послідовності мРНК різних генів *A. thaliana* значно відрізняються; в результаті ефективність швидкості їхнього перекладу значно змінюється (більш ніж у 200 разів) [15]. Окрім того, рівень трансляції рекомбінантних білків можна значно підвищити, шляхом оптимізації нуклеотидних послідовностей. Однак заміна кодонів не завжди може приводити до збільшення рівня накопичення рекомбінантних білків у рослинних тканинах [14].

Зазвичай для створення векторної системи використовують геном чи елементи геному вірусів рослин, оскільки вони мають невеликі розміри і дуже легко реплікуються в клітинах господарів. Тому використання векторних систем на основі вірусів рослин сприяє високому вмісту білків, які виробляються за дуже короткий проміжок часу [16].

1.1.1 Вірусні векторні системи. Вірусні вектори проявляють високу швидкість функціонування при експресії генів, а тому є придатною платформою для отримання рекомбінантних білків. Експресія генів з використанням вірусних векторів дозволяє швидко та у великому обсязі виробляти рекомбінантні білки у тканинах рослин. У такій системі рослини часто вирощують у контрольованому приміщенні для запобігання надходження трансгенних рослин назовні, а також для забезпечення рівномірної продуктивності [2].

Відповідно до способу проектування вектори класифікують на вектори першого та другого покоління. Вектор першого покоління, або вектор повного вірусу використовує повний геном вірусу і експресія чужорідного гена базується на функціональному поколінні вірусу. Основними проблемами векторів першого покоління є низька вірулентність, що призводить до зниження рівня експресії та накопичення рекомбінантних білків. На відміну від першого, у векторі другого покоління вірусний геном редагується шляхом усунення зайвих послідовностей, а модифікований геном спрямований на реплікацію та переклад цільової послідовності [4,17].

Для деконструювання та створення векторів використовуються вісім різних родів РНК-вірусів рослин, включаючи потексвіруси [18,19], томбусвіруси, тобамовіруси, бромовіруси, комовіруси, беннівіруси, потівіруси та кукомовіруси. Крім того, для розвитку вірусних векторів також використовуються невеликі кільцеві геноми ДНК-вірусів родини *Geminiviridae* [3,20]. Окрім цільового гена та вірусної частини, вектори також мають промотор, який є важливим для початку експресії. Змінюючи промотор можна змінювати і швидкість експресії гена.

Була розроблена векторна система для отримання біологічно активного рекомбінантного людського інтерферону α -2b (rhIFN α -2b), за допомогою транз'єнтно́ї експресії в рослинах *Nicotiana benthamiana*. Генну конструкцію, що містила модифікований ген людського інтерферону α -2b, клонували у двох векторах на основі TMV, керованого актиновим промотором (pA-IFN-A) та вірусом мозаїки цвітної капусти, керованим 35S промотором вірусу мозаїки цвітної капусти (pA-IFN-S) (рис.1.1). Рекомбінантний інтерферон α -2b, синтезований у рослині, виявив високу противірусну та протипухлинну активність, порівнянну з дією комерційного препарату [21].

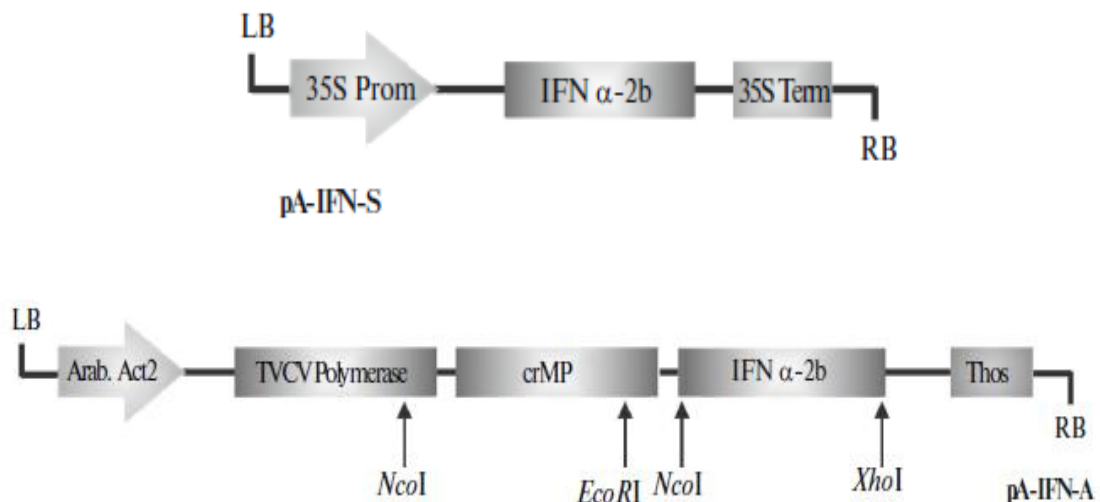


Рис.1.1. Схематичне зображення векторів pA-IFN-A та pA-IFN-S, що знаходяться під актиновим та 35S промотором відповідно [21].

Вірус мозаїки репи (TuMV) належить до родини *Potyviridae* і вражає широкий спектр рослин. Цю особливість використовують для порівняння функціонування вірусного вектора у різних рослин. Враховуючи широкий спектр враження вірусу, використання вектора TuMV може бути більш економічно вигідним у масовому виробництві рекомбінантних білків [22].

Функціонування вірусного вектора TuMV було перевірено при дослідженні ефективності продукції рекомбінантних білків у рослинах роду

Nicotiana (*N. tabacum* та *N. benthamiana*). Плазміда містила промотор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV 35S) та ген репортерного білка GFP, розташований між генами NIb (білком ядерного включення), та CP (білок оболонки), як зображено на рис. 1.2. Листки двох видів тютюну були інфільтровані суспензією з описаним вектором. Наявність флуоресцентного білка була встановлена з допомогою RT-PCR, Dot-Blot аналізу, флуоресцентної мікроскопії та ELISA. За результатами експерименту білок детектувався у достатній кількості у обох видах *Nicotiana* [22].

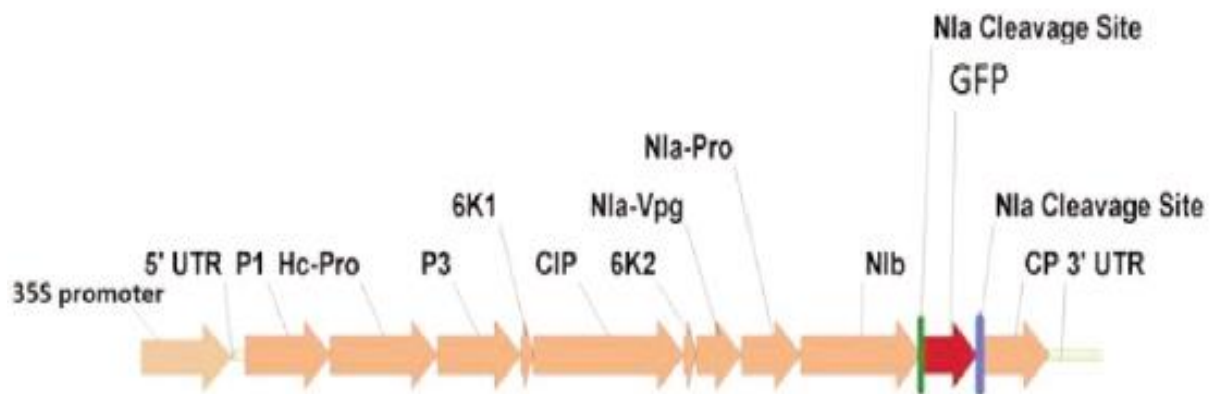


Рис.1.2. Схематичне зображення вірусного вектора. Червоною стрілкою відмічений репортерний білок GFP [22].

Використання 35S промотору було описано в роботі [12]. Вектор експресії містив 35S промотор, 5'-UTR генома PVX (вірусу картоплі X), ген вірусної РНК-полімерази (RdRP), промотор гена транспортного білка PVX 25K (Sgp1), репортерний ген *gfp* ліворуч від лідерної послідовності AMV, і 3'-UTR геному PVX та NosT термінальну послідовність, як зображено на рис.1.3. На 5' та 3' кінцях *gfp* розташовані унікальні сайти рестрикції *AscI* і *SmaI*, що використовувались для клонування цільового гена (M2eHBc) та видалення *gfp*. З використанням даної удосконаленої системи вдалось підвищити продукування білка в листках *Nicotiana benthamiana* до 1 мг/г.

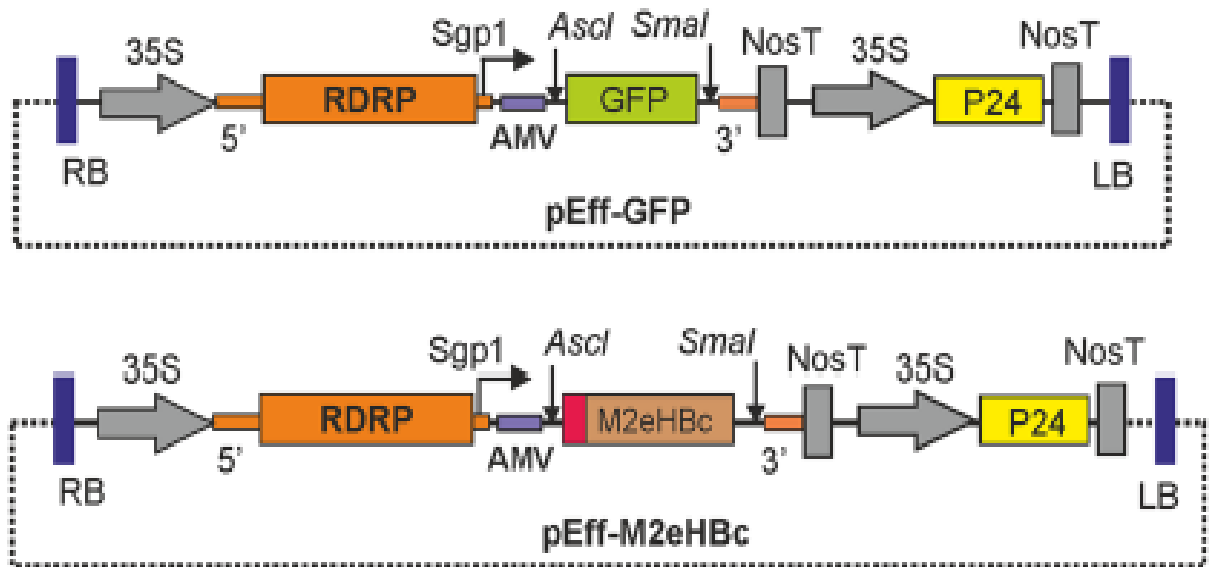


Рис.1.3. Схематичне зображення вірусного вектора pEff-GFP та pEff-M2eHBc.

Відомо, що посттранскрипційний сайленсинг генів є однією з причин низького рівня експресії рекомбінантних білків в агроінфільтрованих листках [12,22]. Сайленсинг РНК – один з основних захисних механізмів, які використовуються рослинами для боротьби з вірусами. У вірусів натомість є специфічні білки-інгібітори, що здатні пригнічувати чи повністю нейтралізувати посттранскрипційний сайленсинг [23]. Для подолання цієї проблеми, додатково, ліворуч від термінальної послідовності NosT, додано репресор сайленсингу генів P24, P19, P25, CP, що значно підвищило ефективність вірусного вектора [12,24,25]. Альтернативний спосіб подолання посттранскрипційного сайленсингу генів полягає в процедурі попереднього інфільтрування листків *Nicotiana* бактеріальною суспензією, що несе в собі плазмиду з геном допоміжного компонента протеїнази вірусу картоплі А, що в свою чергу проявляє високу активність репресора сайленсингу РНК. Приєднання аналогу кеп-структури 7-метилгуанозин-5'-трифосфо-5'гуанозину додатково посилює ефект дії вищезгаданого механізму через підвищення стабільності мРНК та взаємодію з еукаріотичним фактором ініціації транскрипції [26].

Існує багато інших факторів, що впливають на ефективність вірусних систем експресії, серед них: активність промотора, швидкість трансляції, розмір вектора тощо. На швидкість синтезу білків також впливають абіотичні фактори, такі як джерело світла та температура [2].

1.2. Транзйентна експресія опосередкована *Agrobacterium tumefaciens*

Рекомбінантні білки в рослинах можуть бути отримані як стабільною генетичною трансформацією (ядерною або пластидною), так і транзйентною експресією [27,28]. Тимчасову, або транзйентну експресію зазвичай використовують для швидкої та гнучкої експресії генів інтересу, оцінки продуктивності систем експресії та функціонування таких компонентів, як промотори, енхасери та репресори сайленсингу [22,25].

Agrobacterium tumefaciens широко застосовується для створення стабільних трансгенних рослин, однак останнім часом використовується і для досягнення транзйентної експресії генів у рослинах. Агробактерії використовуються у генній інженерії завдяки природній здатності *A. tumefaciens* інтегрувати визначений сегмент ДНК (Т-ДНК) у геном рослини-господаря, що визначається Ті-плазмідною. Власне Ті-плазміда має дві ключових ділянки: Т-ДНК та *vir*-ділянка. Т-ДНК оточена повторюваними послідовностями довжиною близько 25 bp ліворуч та праворуч від неї (позначають відповідно лівий та правий край), що несуть гени задіяні у синтезі рослинних гормонів та опінів. *Vir*-ділянка містить гени необхідні для транспорту на інтеграція Т-ДНК в геном [9]. Рівень транзйентної експресії в такому разі буде сильно залежати від кількості копій Т-ДНК, що потрапила до клітини господаря [29]. Для транспорту Т-ДНК в організм-господаря та експресії гена інтересує необхідні наступні кроки [30]:

- 1) активація генів *vir*-ділянки;
- 2) адгезія бактерій до поверхні рослинної клітини;
- 3) вирізання Т-ДНК з Ті-плазміди;

- 4) транспорт білків вірулентності та Т-ДНК в цитоплазму господаря;
- 5) утворення комплексу Т-ДНК з транспортними білками цитоплазми;
- 6) транспорт комплексу Т-ДНК в ядро господаря;
- 7) експресія трансгенів без інтеграції в геном господаря,
- 8) розщеплення чужорідної ДНК.

Після транспорту одониткової Т-ДНК до цитоплазми клітини господаря Т-ДНК рухається до ядра безперервно. У ядрі Т-ДНК не інтегрується в хромосому. Після транскрипції Т-ДНК утворюється мРНК, яка подібна на вірусну РНК. Першим продуктом трансляції цієї мРНК є РНК-залежна РНК-полімераза, яка коротко відома як RdRP. Як тільки продукується достатня кількість RdRP, цей фермент починається транскрипція мРНК, яка у свою чергу утворилась із Т-ДНК. Це призводить до продукування (-)РНК від 3' до 5' кінця. Після утворення достатньої кількості мінус РНК, починається транскрипція (-)РНК від 3' до 5' з допомогою RdRP, що призводить до отримання 5' - 3' субгеномних РНК. Кожна субгеномна РНК проходять етап трансляції у рибосомах рослинної клітини та продукує цільових білок (рис.1.4) [31].

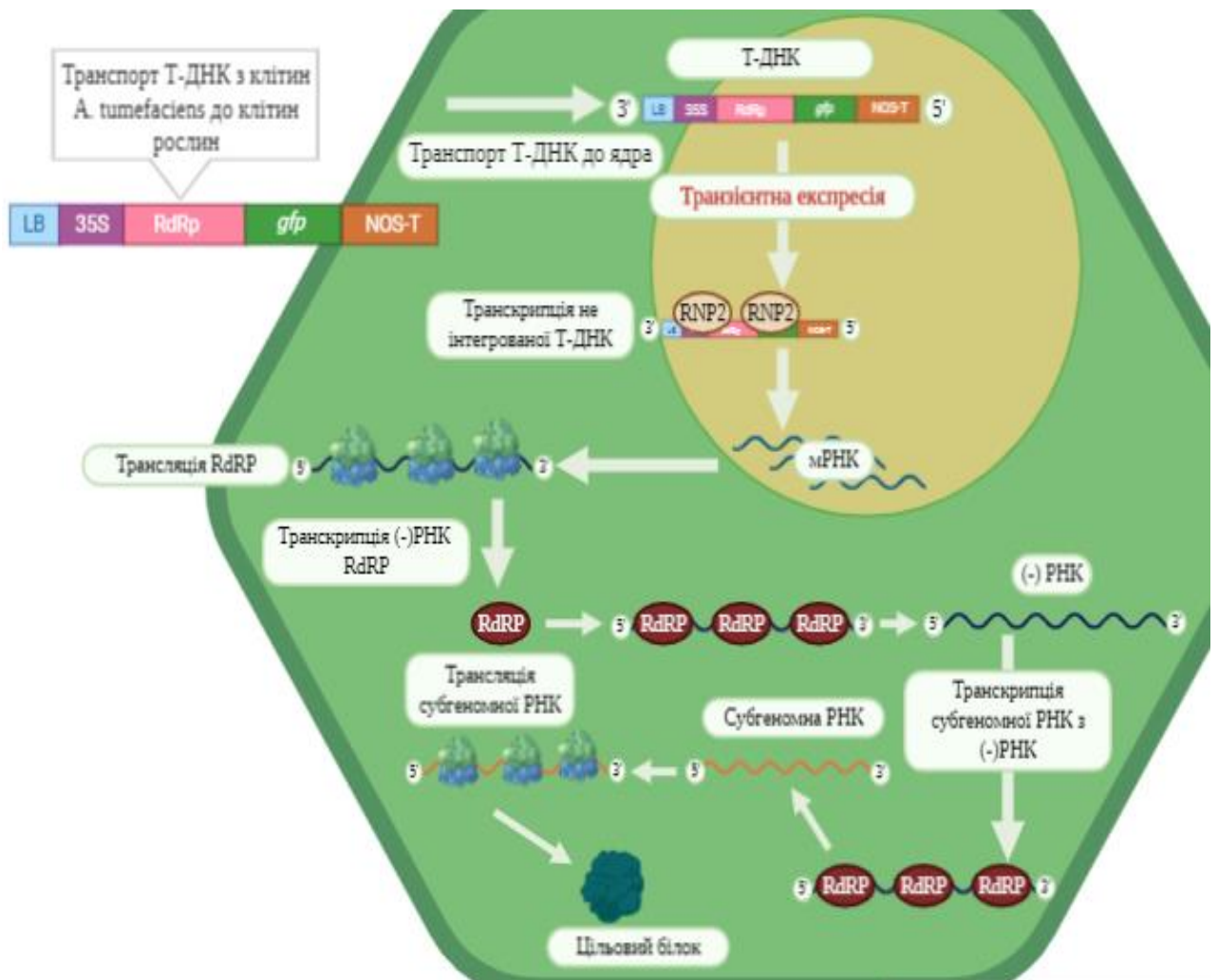


Рис.1.4. Схематичне зображення транз'єнтної експресії в середині рослинної клітини на прикладі вірусної векторної системи (зі змінами [31]).

Підвищення рівня експресії трансгена можна досягти шляхом додавання репресора сайленсингу. Тип генетичної конструкції теж впливає на рівень експресії, тому максимальна кількість білка може спостерігатись як через 4 дні, так і через 1–2 тижні після інфільтрації [32].

Транз'єнтна експресія є безпечною, оскільки попереджається поширення чужорідних генів у зовнішньому середовищі серед рослин господарів. Цей метод також дає змогу швидко протестувати та оптимізувати умови для експресії генів та отримання більш продуктивних ліній рослин [32].

1.3. Флуоресцентні білки та їх використання в генній інженерії

Як вже було згадано вище, системи експресії та векторні конструкції потребують швидких методів перевірки їх функціонування. Для досягнення цієї мети використовують репортерні гени. Серед них особливе місце займають гени флуоресцентних білків [33–35]. Гени флуоресцентних білків можуть бути розташовані в одній рамці зчитування поряд з генами інтересу. Це дозволяє спостерігати за розміщенням, рухом та навіть розпадом білків у клітині [34]. Репортерний білок має відповідати ряду характеристик, тобто не має проявляти цитотоксичної дії, має бути придатним для клонування та вимірювання експресії гена має бути спростим і доступним [36].

Зелений флуоресцентний білок (GFP) відповідає вище згаданим характеристикам та використовується як маркер *in vivo* для спостереження за трансгенними рослинами. Простота його використання, вимірювання флуоресценції без додаткових білків, субстратів або кофакторів, а також висока стабільність роблять його потужним інструментом моніторингу [37]. GFP має малу молекулярну масу (близько 25 кДа) та завдяки великій кількості нековалентних зв'язків, забезпечується висока стійкість до термічної чи хімічної денатурації, а також стійкість до протеолізу [34,38]. Хромофор, основний елемент, завдяки якому відбувається легке детектування експресії гена, поглинає синє або ультрафіолетове (УФ) світло (діапазон ~ 400-480 нм) і випромінює флуоресцентне зелене довжиною хвилі 510 нм [39].

Таким чином, GFP можна використовувати, як маркер *in vivo* для характеристики цільових генів та білків у трансформованій клітині або тканині, не піддаючи матеріалу руйнуванню та тривалій або летальній процедури аналізу [35,39].

GFP має значну перевагу порівняно з іншими флуоресцентними білками, оскільки має малу молекулярну масу та переважно не утворює олігомерів. Однак у генній інженерії також використовуються білки, що можуть утворювати тетрамери, наприклад DsRed (червоний флуоресцентний білок, вперше виявлений у коралі роду *Discosoma sp* [40]. Хромофор DsRed

утворюється з попередника подібного до хромофору GFP додатковим окисненням C α -N зв'язку залишку в положенні 65. Це окиснення призводить до розширення π системи та призводить до різкого батохромного зрушення спектру збудження-випромінювання.

Червоний флуоресцентний білок, успішно використовувався як візуальний маркер у генній інженерії [41,42]. DsRed2 був успішно експресований в культурах бавовни та ембріодах кукурудзи (*Zea mays L.*) [41] під промотором CaMV-35S за допомогою трансформації, опосередкованої *Agrobacterium*. DsRed2 дозволяє візуально спостерігати за експресією цільового гена в калюсних культурах. Червона флуоресценція може бути виявлена не тільки в калюсі, а й в ембріодах та у більшості тканинах та органах зрілих рослин [42].

На відміну від описаних вище флуоресцентних білків синій флуоресцентний білок (BFP) може використовуватись разом із GFP як маркер поширення вірусу в організмі рослин (наприклад, *Nicotiana spp*) [43]. Основною перешкодою для використання двох маркерів одночасно є різна стабільність BFP та GFP та різний оптимальний рівень кислотності.

1.4. Рекомбінантні білки у рослинних системах

Останнім часом рослини стали перспективною системою виробництва рекомбінантного білка. Перевагами використання рослин для виробництва білка є низька вартість виробництва, до прикладу, за дослідженням [44], використання рослин для продукції бутирилхолін естерази знизить загальні витрати на 85%, порівняно з традиційною технологією з використанням грибів, а вартість виробництва рекомбінантної глутамат декарбоксилази, для виробництва якої зазвичай використовують культури клітин комах, знизиться більше, ніж на 90% [23]. Використання рослин є безпечним оскільки відсутнє забруднення ендотоксинами та збудники хвороб, що загальні як для рослин, так і для тварин [45].

Рослинні і тваринні білки відрізняються типом глікозилювання та структурою вуглеводневих частин, що може змінювати активність або тривалість життя рекомбінантних білків порівняно з їх природними аналогами і викликати імунну реакцію у людей. Хоча порівняно з типовим способом отримання рекомбінантних білків з використанням бактерії (наприклад, *E. Coli*), у яких відсутній механізм глікозилювання білків – використання еукаріотичних організмів, а саме рослин, є набагато перспективнішим [12].

1.4.1 Рекомбінантні білки у рослин роду *Nicotiana*. *Nicotiana tabacum* L. (звичайний тютюн) належить до родини *Solaceae* (Пасльонові). Тютюн – це найпоширеніша рослина для експресії трансгенів, оскільки він легко вирощується та трансформується. *Nicotiana tabacum* (тютюн) має короткий життєвий цикл і містить відносно великі листки, що легко інфільтрувати, та які здатні продукувати рекомбінантні білки на високому рівні [45]. На сьогодні у *Nicotiana tabacum* успішно отримують антиген HA1 вірусу грипу H5N1. Рівень експресії білка знаходився в діапазоні 17,9 – 29,2, вміст рекомбінантного білка становив 8,8% від загального вмісту білків [46].

Високо ефективним продуцентом також є *Nicotiana benthamiana*. На сьогодні було отримано рекомбінантний гемаглютинін вірусу собачого грипу штаму H3N2 з високою активністю. Було показано, що отриманий гемаглютинін був глікозилюваний, що є необхідним для створення вакцини від вірусу собачого грипу [20].

Для виробництва вакцини проти класичної свинячої чуми у *N. benthamiana* за допомогою рСAMBIA1300 бінарного вектора вводили послідовність MELCHE2 (рис.1.5), що містила ген глікопротеїну класичного вірусу чуми свиней (E2).

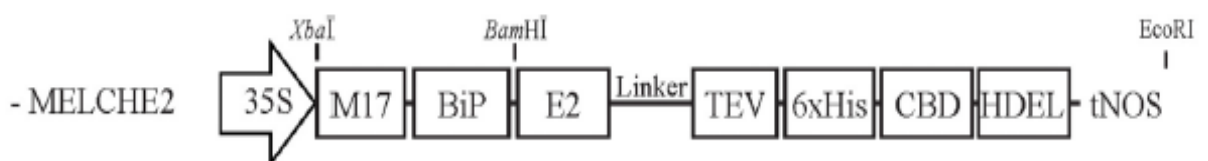


Рис.1.5. Схематичне зображення конструкту MELCHE2 .

Отриманий білок характеризувався антигенними та імуногенними властивостями, що є обов'язковим для вакцини. У досліджах було показано, що вакциновані поросята набували захисту від вірусу чуми вже на одинадцятий день, тоді як комерційна вакцина E2 надавала захист лише на 14 день. Для пришвидшення ефекту було рекомендовано збільшити дозу вдвічі [47].

Про виробництво антигена в рослинах *N. benthamiana* для діагностики вірусу Денге було повідомлено у [48]. Неструктурний білок 1 (non-structural protein 1) може бути використаний у серологічних тестах. Цей білок експресований у рослинах, був сполучений з еластин-подібним білком та в свою чергу приєднаний до ендоплазматичного ретикулу, що значно підвищувало вихід білка (близько 445 мг/кг). Ймовірно це було спричинено тим, що ЕПР значно підвищував ефективність глікозилування, а наявність білків шаперонів сприяло правильному набуттю третинної структури. Отриманий білок розпізнавав антитіла у сироватці крові людини зараженої вірусом Денге, чутливість тесту становила 48%. Попри низьку чутливість, ще одним недоліком цього рекомбінантного білка є його низька стабільність, що потребує додаткових маніпуляцій для її підвищення.

Окрім антигенів відомо й про виробництво рекомбінантних ферментів у *N. benthamiana*. Бутирилхолінестераза – тетрамерний білок, що став ефективним проти нервових агентів – органофосфатів. За допомогою транз'єнтної експресії у *N. benthamiana* було одержано досить високий вихід ферменту (0,78 од./мг), а також доведено його активність. Використовуючи лінії тютюну, в яких вимкнено гени ферментів фукозил та ксилозил трансфераз було одержано препарат із значно меншою імуногенністю та алергенністю [49].

Для виробництва рекомбінантних білків використовуються й інші не менш продуктивні види роду *Nicotiana*, такі як *N. exelsitor*, *N. cavicola*, *N. debnii* та ін [50].

1.4.1.1 Рекомбінантні білки у рослин виду *Nicotiana rustica*. На сьогодні немає джерел, що б вказували на використання *N. rustica* в якості платформи для виробництва рекомбінантних білків, а також у як модельного організму для удосконалення роботи векторних систем.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика об'єкту дослідження

Об'єктом дослідження була рослина виду *Nicotiana rustica*, що були вирощенні у тепличних умовах в рамках експерименту. Вік рослин перед інфільтрацією агробактеріальною суспензією становив шість тижнів (до періоду цвітіння).

У продовж всього експерименту рослини зберігались в тепличних умовах (при температурі 20-22 °C).

2.2. Реактиви, матеріали та обладнання

2.2.1 Реактиви. У роботі використані наступні реактиви: казеїн («Sigma-Aldrich», США), екстракт дріжджів («Merck», Німеччина), хлорид натрію («Хімотест», Україна), сульфат магнію («Sigma-Aldrich», США).

2.2.2. Характеристика векторних конструкцій. Для експерименту були використані три векторні системи: PУ2, PУ5 та P90 (рис.2.1). Кожна з трьох плазмід включала в себе репортерний ген *gfp*. PУ2 містила полімеразу вірусу картоплі Х за промотором CaMV 35S, білок оболонки вірусу (CP) ліворуч від субгеномного промотора SgPr25K. Одразу за ним у вірусну векторну систему вбудували три гени трьох вірусних білків 25K, 12K та 8K, відповідно поєднаних із субгеномним промотором SgPr25K та ген *gfp*, що знаходився під субгеномним промотором SgPrCP (рис.2.1A). На інших ділянках листків була використана векторна система PУ5, що подібно до першої включала в себе репортерний ген *gfp*, що поєднали із промотором CaMV 35S, 5'UTR та Nos термінатором. Додатково був введений ген інгібітора посттранскрипційного сайленсингу генів p19, що подібно до гена *gfp* поєднали із промотором CaMV 35S, 5'UTR та термінатором октопін синтази (OscTer), як зображено на

рис.2.1Б. Третя плазміда містила в собі лише репортерний ген *gfp*, що поєднали із промотором CaMV 35S, 5'UTR та Nos термінатором.

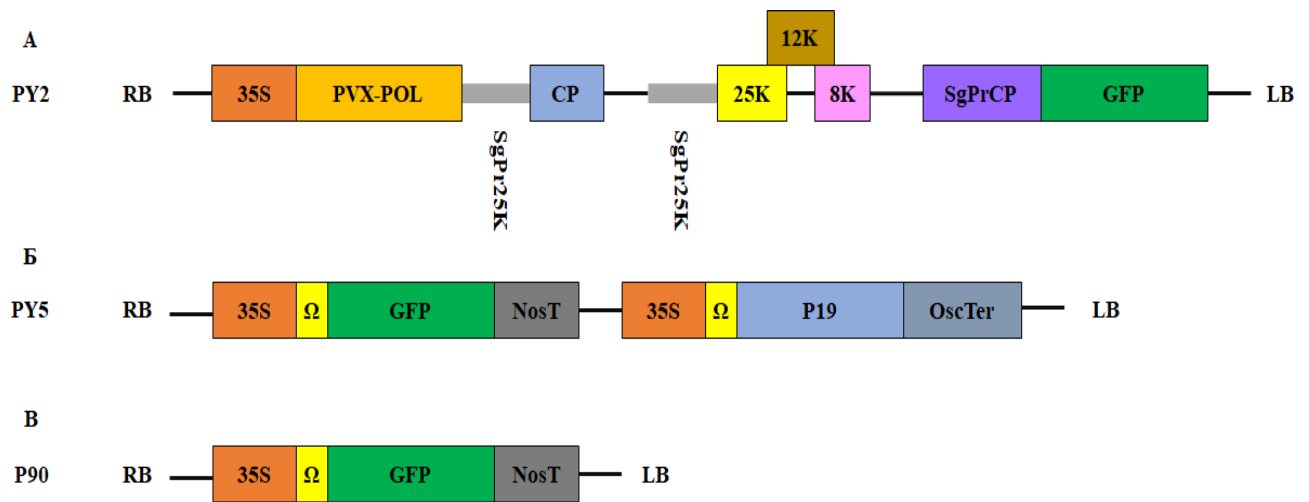


Рис.2.1. Схематичне зображення векторних систем використаних у експерименті.

2.2.3. Обладнання. Під час виконання роботи використовували таке **обладнання:** спектрофлуориметр “Флюорат-02 ПАНОРАМА” (Росія), ультрафіолетова лампа DL-01 (Україна).

2.3. Методи

2.3.1. Методи, використані для вирощування рослин виду *Nicotiana rustica*. *Nicotiana spp.* насіння було отримано з «Національного банку зародкової плазми рослин флори України та світової флори Інституту клітинної біології та генетичної інженерії» (Київ, Україна). Насіння вирощували в нестерильних умовах (господарський ґрунт). Рослини росли в тепличних умовах: 16-годинний світловий день при 22–28 ° С, 3. Для експериментів використовували рослини віком 6–8-тижнів.

2.3.2 Методи, використані для культивування *Agrobacterium tumefaciens*. Культуру бактерій *A. tumefaciens* вирощували на ротаційному шейкері на середовищі LB (lysogeny broth) при 28°C.

Склад живильного середовища (на 500 мл):

- 1) 10 г казеїну;
- 2) 5 г екстракту дріжджів;
- 3) 10 г хлориду натрію.

2.3.3 Методи, використані для інфільтрування рослин виду *Nicotiana rustica*. Для передачі чужорідної ДНК та інтеграції її до геному рослини був використаний метод агробактеріальної трансфекції. Він заснований на використанні *Agrobacterium tumefaciens* і дотепер найчастіше використовується на практиці.

Для бактеріальної інфільтрації нарощували агробактерії з векторними конструкціями PУ2, PУ5 та P90 на середовищі LB 8-10 годин. Для подальших маніпуляцій придатна бактеріальна суспензія з показником оптичної густини 0,6 і більше. Відібрану суспензію осаджували на центрифугі протягом 10-15 хв при 2 500 оберт/хв для відбору осаду та розводили в близько 5 мл розчину 10 мМ MgSO₄. Обов'язковою ознакою суспензії готової до інфільтрування є – показник оптичної густини, що дорівнює одиниці. Чистою голкою зі зворотного боку листка робили укол в декількох місцях та шприцом під невеликим тиском закачують бактеріальну суспензію в міжклітинний простір. В середньому об'єм закачаної суспензії може варіювати від 1 мл до 1,5 мл. Площу інфільтрації обводили маркером для зручності візуалізації результатів [51].

Інфільтровані рослини залишили для подальшого росту при тепличних умовах.

2.3.4 Методи, використані для вимірювання експресії гена *gfp in vivo*.

Для прижиттєвого вимірювання флюоресценції білка GFP був використаний метод спектрофлуориметрії. Для флюоресцентного білка GFP характерний діапазон випромінювання 509-510 нм [52]. Виміри зняли з шести листків попередньо інфільтрованих рослин з інтервалом два дні між вимірюванням (3, 5, 7...).

Виміри були зроблені на спектрофлуориметрі («Флюорат-02 ПАНОРАМА», РФ), що зображений на рис.2.2.



Рис.2.2. Спектрофлуориметр «Флюорат-02 ПАНОРАМА».

Виміри проводили зі зворотного боку листка. Ділянку, у якій попередньо спостерігали накопичення GFP завдяки опроміненню ультрафіолетовою лампою поміщали у виносний аналізатор (рис.2.3) та щільно притискали, щоб попередити потрапляння світла ззовні.



Рис.2.3. Зображення виносного аналізатора спектрофлуориметра «Флюорат-02 ПАНОРАМА»

Графіки були побудовані з допомогою програми “Panorama Pro”. Показники знімались у діапазоні 480-580 нм та відмічались на графіку за реєстрацією збудження на рівні 510 нм.

2.3.5. Методи використані для статистичної обробки результатів. Для маніпуляцій зі статистичними даними використовували стандартне відхилення (СВ) та метод Стьюдента.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Батьківщиною махорки *Nicotiana rustica* є Північна Америка. Цей вид є основним у виробництві тютюну, через високий вміст нікотину в його листках. *N. rustica* подібно до *N. benthamiana* та *N. tabacum* чутливий до вірусів, що дозволяє припустити, що *N. rustica* разом з *N. benthamiana* може використовуватися для продукції рекомбінантних білків за допомогою транз'єнтної експресії, якщо ген розташований у вірусній векторній системі.

Для дослідження біологічного потенціалу *N. rustica* порівнювали три згадані види за кількома параметрами: ріст в тепличних умовах, біометричні показники, легкість процедури інфільтрації. Додатково зробили порівняльний аналіз функціонування трьох векторних систем.

3.1. Порівняння видів *N. tabacum*, *N. benthamiana* та *N. rustica* на основі біометричних показників

Виявили, що *N. rustica* можна використовувати для експериментів з транз'єнтною експресією у віці 6–8 тижнів, до цвітіння, подібно до *N. benthamiana*. *N. rustica* демонструє ефективний та швидкий ріст в тепличних умовах. У дорослої рослини *N. rustica* значно більші листки, ніж у попередніх двох видів. Для цього були проведені виміри біометричних показників листків *N. tabacum*, *N. benthamiana* та *N. rustica*. Як показано в таблиці 1, один листок *N. rustica* важив більше, ніж у *N. benthamiana* і *N. tabacum*. Різниця була суттєвою ($P < 0,001$).

Таблиця 1

Порівняння біометричних показників *Nicotiana spp* вирощених за тепличних умов

Вид	Вага листків у грамах \pm стандартне відхилення (СВ)					
	Лист 1	Лист 2	Лист 3	Лист 4	Лист 5	Лист 6
<i>N. tabacum</i>	2,52 \pm 0, 53	2,77 \pm 0,4 1	3,31 \pm 0,3 5	3,94 \pm 0,3 0	4,75 \pm 0,16	4,85 \pm 0,44
<i>N. bentamiana</i>	0,48 \pm 0, 04	0,70 \pm 0,0 5	0,74 \pm 0,1 0	0,77 \pm 0,0 7	0,75 \pm 0,04	1,13 \pm 0,01
<i>N. rustica</i>	6,38 \pm 0, 41	8,34 \pm 0,5 2	8,62 \pm 0,6 3	9,33 \pm 0,6 4	10,98 \pm 0,7 9	11,88 \pm 0,6 4

3.2. Порівняння ефективності функціонування плазмід

Для оцінки ефективності функціонування векторних систем в *N. rustica* застосовували репортерний білок, GFP, в зв'язку з тим, що для його виявлення не потрібно постійно проводити екстракцію білка. Ця властивість GFP дозволяє спостерігати динаміку його накопичення в клітинах *Nicotiana*. Зелена флуоресценція була виявлена під короткохвильовим УФ-світлом в інфільтрованих областях, що підтверджувало наявність рекомбінантного білка GFP.

У експериментах використовували три векторні системи, що несуть ген *gfp*. Перша векторна конструкція, PУ2 вірусна, яка включала в себе ген *gfp*, керований промотором CaMV 35S, ген полімерази вірусу картоплі X (PVX-POL) та ген *gfp*, керований вірусним субгеномним промотором (SgPrCP) як зображено на рис.2.1А. Через п'ять днів після інфільтрації білок GFP був виявлений у достатній кількості. Стабільний рівень експресії спостерігали протягом всього експерименту, спад флуоресценції почався лише на 14 день (рис.3.1). Крім того, був можливий ризик поширення системних симптомів в зв'язку з тим, що у векторній системі наявні елементи вірусного геному.

Однак, у інфільтрованих рослинах системних симптомів вірусу картоплі Х не спостерігалось навіть на 14 день.

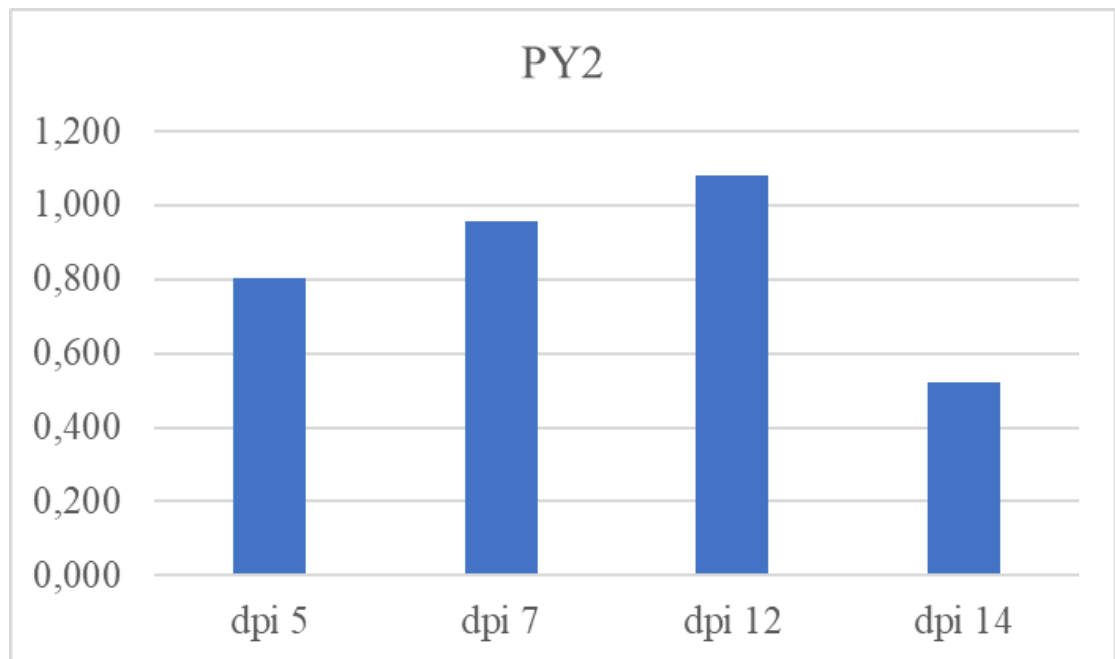


Рис.3.1. Вимірювання рівня експресії гена *gfp* у листках *N. rustica* з векторною конструкцією PY2.

Друга конструкція - транскрипційна, PY5. Ген *gfp* також знаходився під універсальним промотором 35S CaMV. Однак, на відміну від інших, у дану систему додатково був введений ген постраскрипційного інгібітора сайленсингу р19 також керований 35S промотором (рис.2.1Б). Порівняно з вірусною системою PY2, рівень експресії був значно вищим, а білок можна було виявити у достатній кількості навіть на 14 день (рис.3.2). Окрім інгібітора сайленсингу генів в векторній системі PY5 також наявний 3`UTR, що також покращує транз'єнтну експресію генів [28].

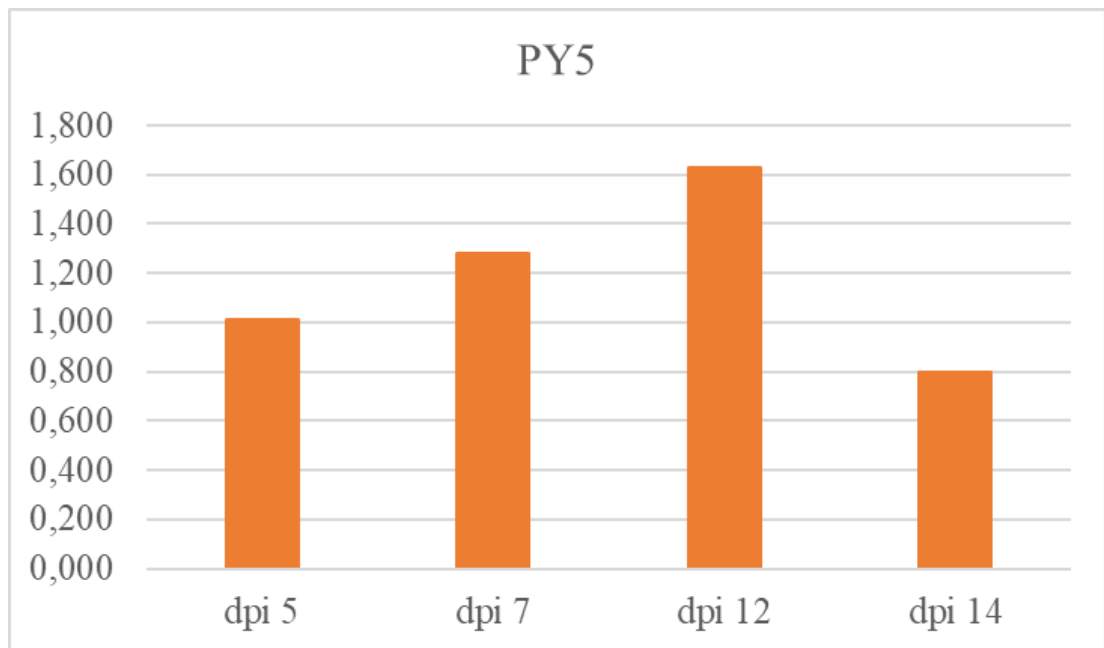


Рис.3.2. Вимірювання рівня експресії гена *gfp* у листках *N. rustica* з векторною конструкцією PY5.

Остання, третя, P90, також транскрипційна векторна система містила лише ген *gfp* керований 35S CaMV промотором (рис.2.1В). Динаміка експресії гена дещо майже не відрізнялась від векторної системи PY2, за виключенням того, що після сьомого дня після інфільтрації спостерігали різки спад інтенсивності флуоресценції, що також засвідчує про спад рівня експресії гена в середині клітини (рис.3.3.).

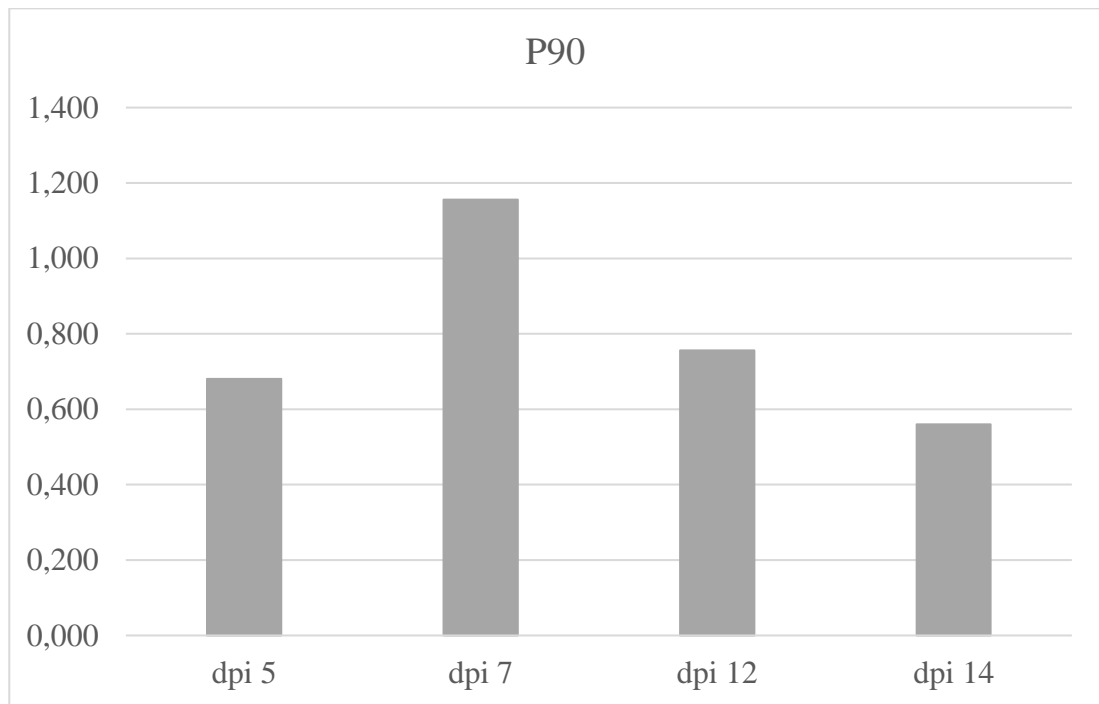


Рис.3.3. Вимірювання рівня експресії гена *gfp* у листках *N. rustica* з векторною конструкцією P90.

На рис.3.4. можна спостерігати, що транскрипційні векторна система PУ5 дає вищий рівень експресії порівняно з вірусною векторною системою PУ2 та транскрипційною P90. PУ90 в свою чергу показує такий же рівень експресії, що й в PУ2, однак має низьку стабільність.

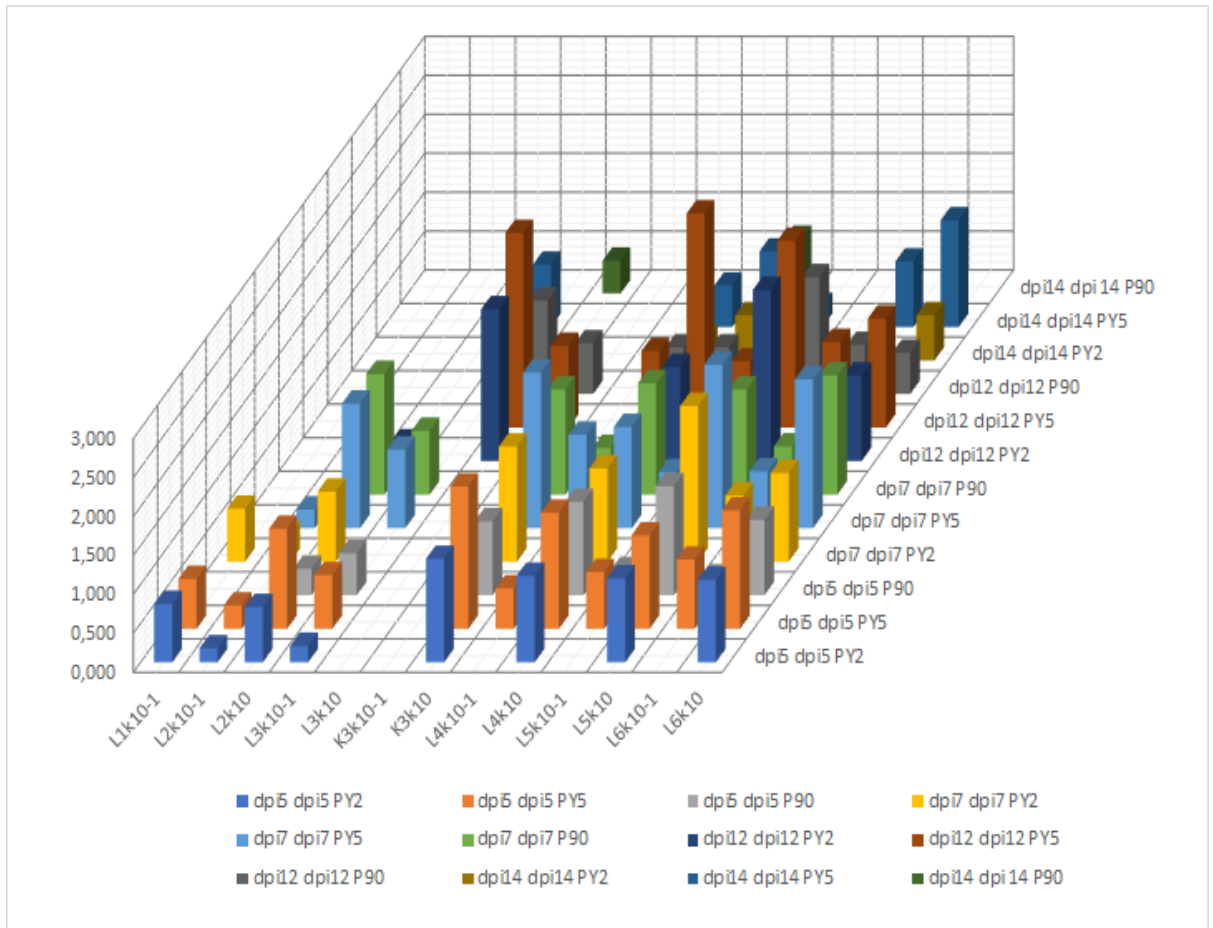


Рис.3.4. Узагальнений графік порівняння рівнів експресії гена *gfp* у трьох векторних системах періодом від п'ятого до чотирнадцятого дня пост-інфільтрації.

3.3. Вплив інгібітора сайленсингу P19 на рівень експресії гена *gfp*

Порівнюючи дві транскрипційні векторні системи, що відрізняються між собою лише наявністю інгібітора сайленсингу РНК р19 (рис.2.1 Б,В), що використовували для підвищення експресії гена. Як показано на рис.3.5 наявність інгібітора сайленсингу генів сприяло експресії гена *gfp* у всіх інфільтрованих листках та зберігало порівняно високий рівень експресії протягом всього періоду експерименту порівняно з векторною системою, в якій відсутній р19.

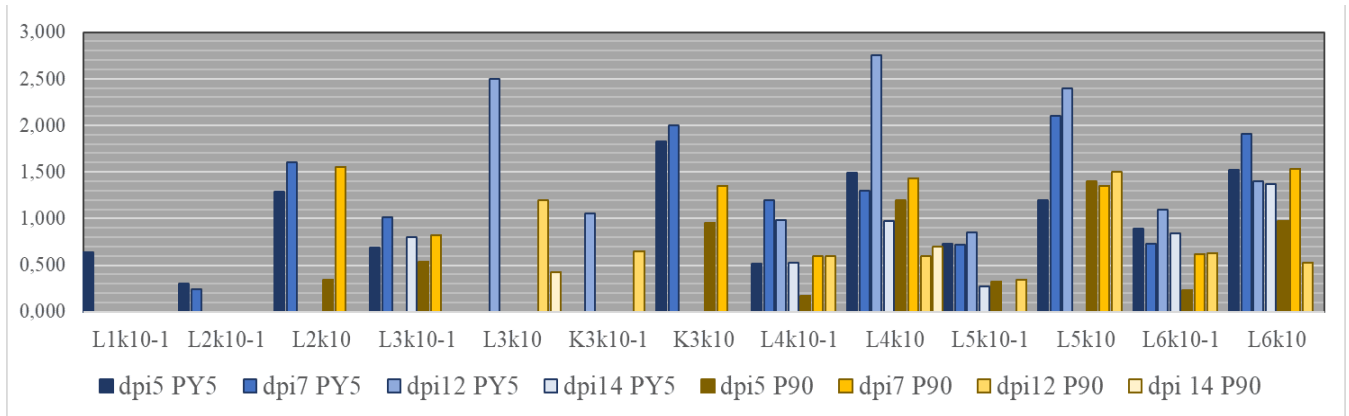


Рис.3.5. Порівняльний графік рівнів експресії гена з використанням векторних конструкції з інгібітором посттранскрипційного сайленсингу генів р19 (відтінки синього) та без (відтінки жовтого).

3.4. Вплив фізіологічного стану листків на рівень експресії гена *gfp*

На рівень експресії генів також впливає стан рослин та безпосередньо листків, які необхідно інфільтрувати. Для цього перевіряли інтенсивність флуоресценції білка GFP у листка різного віку у рослин *N. rustica*.

Відповідно до спостережень, найвищі показники були отримані у листках № 4, 5, 6, що є зрілими та мають більшу біомасу (Таблиця 1), порівняно з листками № 1, 2, 3. Крім того, флуоресценція в зрілих листках зберігалась майже до закінчення експерименту (рис.3.6., рис.3.7., рис.3.8., рис.3.9), тоді як у молодих вона знаходилась нижче порогу ідентифікації вже на дванадцятий день після інфільтрації (рис.3.8).

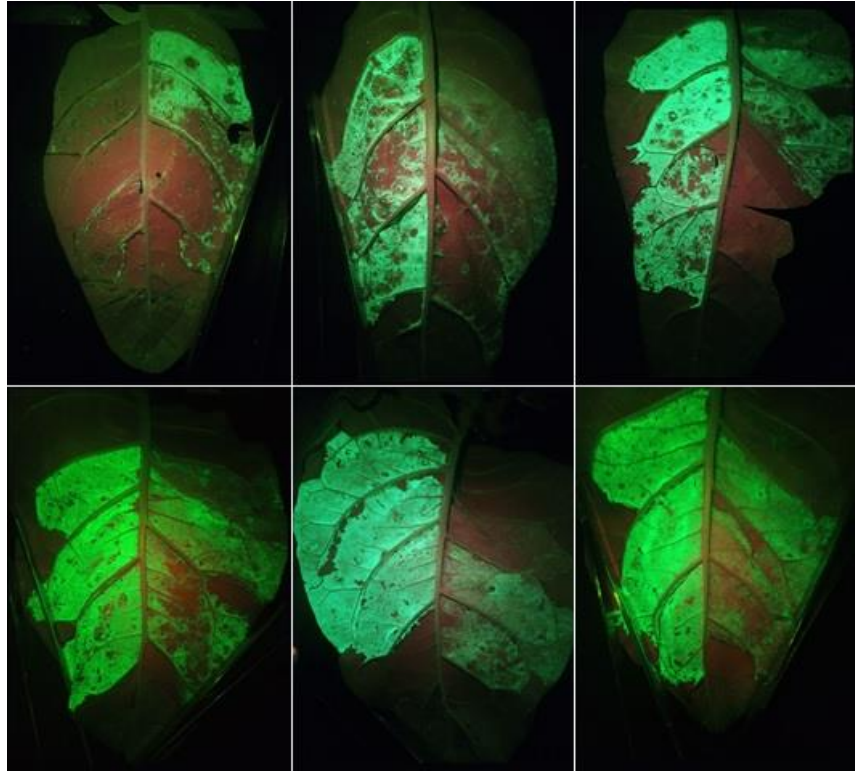


Рис. 3.6. Флуоресценція білка GFP в різних листках *Nicotiana rustica* на 5-й день після агроінфільтрації..

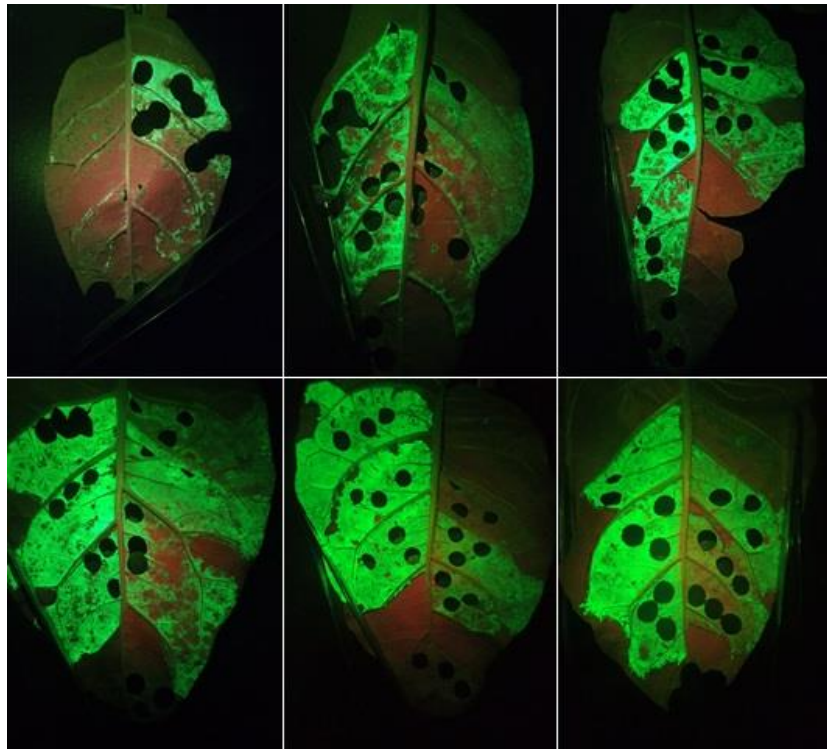


Рис.3.7. Флуоресценція білка GFP в різних листках *Nicotiana rustica* на 7-й день після агроінфільтрації..

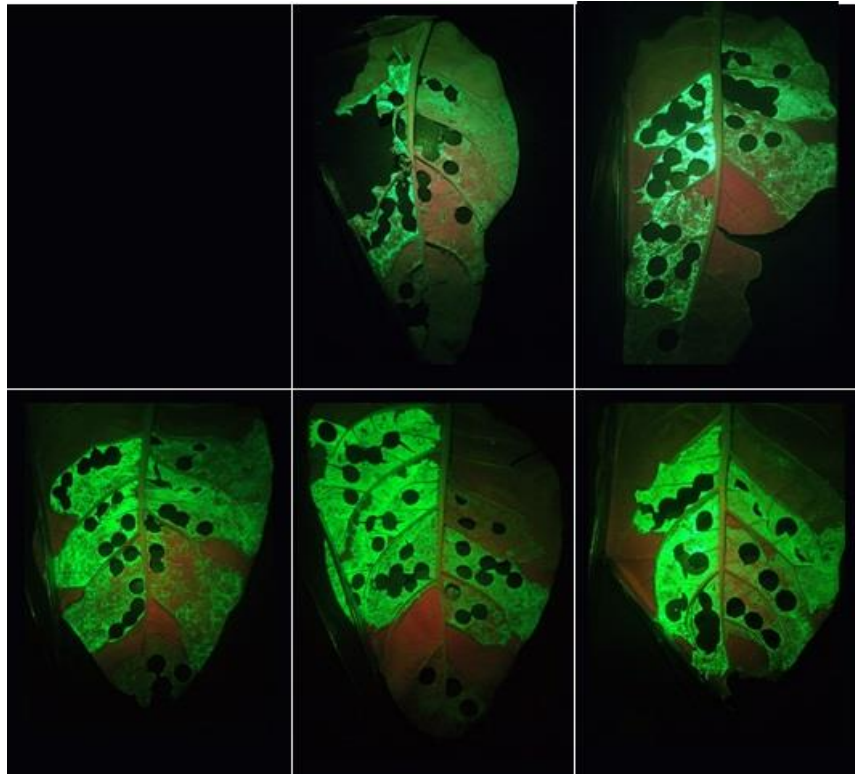


Рис 3.8. Флуоресценція білка GFP в різних листках *Nicotiana rustica* на 12-й день після агроінфільтрації.

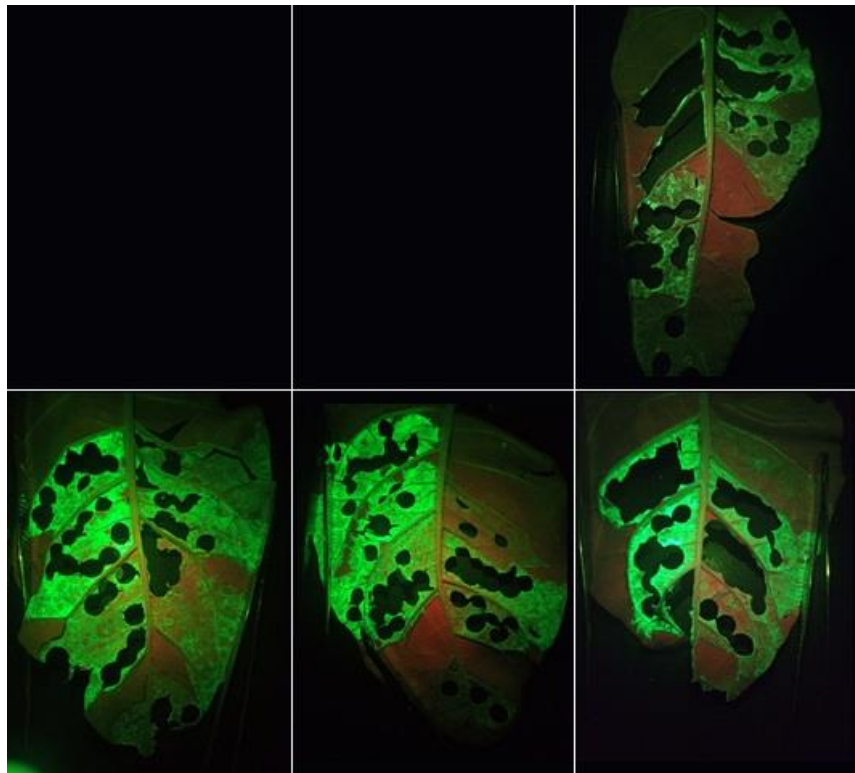


Рис.3.9. Флуоресценція білка GFP в різних листках *Nicotiana rustica* на 14-й день після агроінфільтрації.

Найвищий рівень експресії гена *gfp*, за результатами спектрофлуориметричного аналізу, спостерігався на 12 день після проведення агроінфільтрації у ділянці листків інфільтрованого суспензією агробактерій з векторними конструкціями PУ2 та PУ5 (рис.3.10). Дещо інакше зростав рівень експресії гена *gfp* з використанням векторної конструкції P90. Тут інтенсивність флуоресценції збільшувалася до сьомого дня включно і до кінця експерименту стабільність флуоресценції різко знижувалась.

Для порівняння, у *Nicotiana benthaminana* [50,53] максимальний рівень експресії спостерігався на 14-16 день, а у *Nicotiana tabacum* [22] – на 12 день, подібно до *N.rustica*.

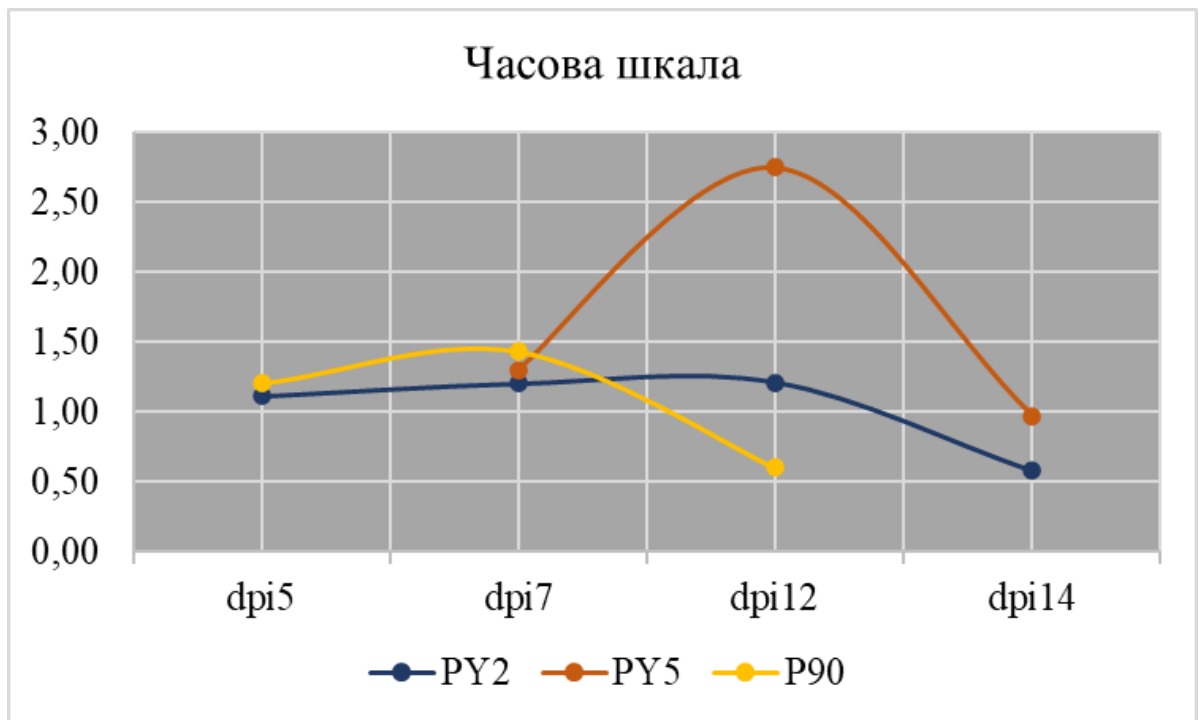


Рис.3.10. Співвідношення рівня експресії гена *gfp* з використанням трьох векторних конструкцій та дня після інфільтрації.

3.5. Вплив концентрації агробактеріальної суспензії на рівень експресії гена *gfp*

Ще одним важливим індуктором експресії опосередкованої інфільтрацією *Agrobacterium tumefaciens* є концентрація введеної бактеріальної суспензії. Для цього зробили дві концентрації бактеріальної суспензії для кожної векторної конструкції та інфільтрували листки *Nicotiana rustica*, як показано на рис.3.11.

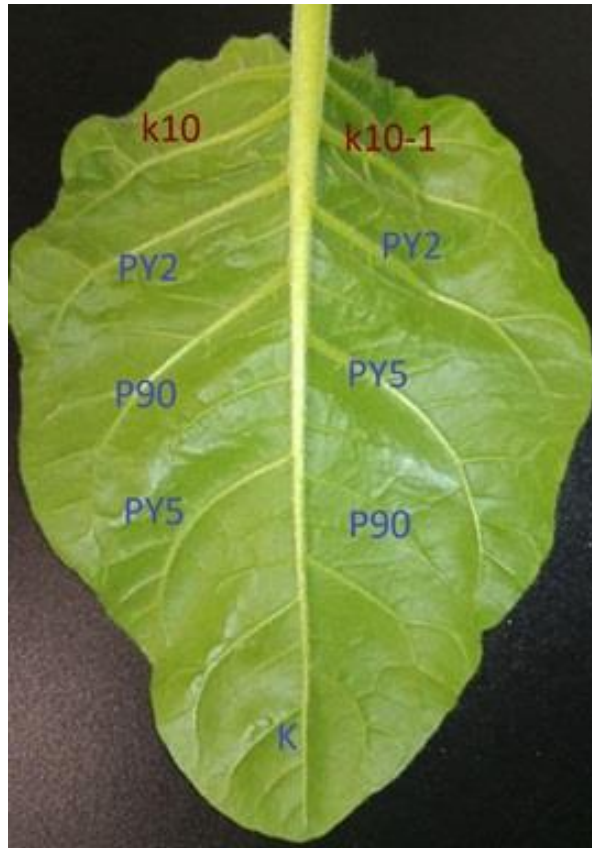


Рис.3.11. Зображення листка *Nicotiana rustica* з відміченими ділянками інфільтрації.

У ділянці листка, де була введена суспензія з концентрацією 10^{-1} спостерігали значно менший рівень експресії, порівняно з ділянками листків, які в рамках експерименту інфільтрували агробактеріальною суспензією з концентрацією 10^1 (рис.3.12).

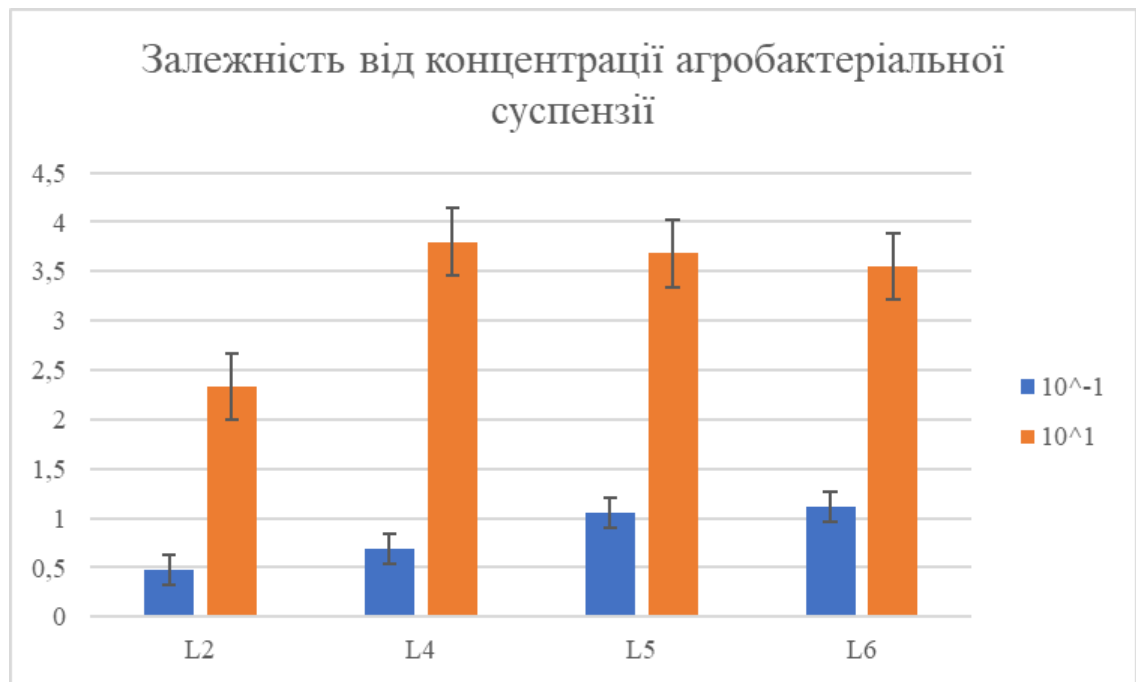


Рис.3.12. Залежність рівня експресії репортерного гена *gfp* від концентрації введеної агробактеріальної суспензії.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У результаті проведених досліджень з метою удосконалення *Agrobacterium*-опосередкованої транзійтної експресії у рослинах виду *Nicotiana rustica* та перевірки функціонування векторних конструкцій встановили ефективність використання трьох плазмід: PУ2, що мала елементи геному вірусу мозаїки картоплі X – ген полімерази, PУ5, що включала в себе ген інгібітору посттранскрипційного сайленсингу генів p19 та P90, що містила лише ген *gfp* під керівництвом промотора 35S CaMV. А також перевірили вплив різних факторів на функціонування згаданих векторних систем.

Ефективність їх застосування було перевірено використовуючи репортерний білок GFP, інтенсивність флуоресценції якого вимірювали за допомогою спектрофлуориметра. У двох системах (PУ2 та P90) спостерігали приблизно однаковий рівень експресії гена незалежно від концентрації суспензії, що була введена, різниця проявлялась лише в тривалості ефекту. У ділянках, що були інфільтровані агробактеріальною суспензією зі векторною конструкцією PУ2 рівень експресії зберігався довше.

Найкращий результат було показано на ділянках інфільтрованих агробактеріальною суспензією з векторною системою PУ5, що містила інгібітор посттранскрипційного сайленсингу p19. Подібний ефект також спостерігався і у найближчого родича *Nicotiana rustica* – *Nicotiana tabacum* [54]. Рівень експресії залишався стабільно високим до кінця експерименту незалежно від концентрації суспензії, як і в попередньому випадку.

Важливими індукторами експресії генів виявився фізіологічний стан листків, оскільки зрілі та листки демонстрували значно вищий рівень експресії, порівняно молодими. Це може бути пов'язано з тим, що у молодих листках переважає експресія генів спрямованих на розвиток листка. Не останнім фактором є біометричні показники листків, оскільки, як було помічено, у листках з більшою біомасою спостерігався й вищий рівень експресії генів. Варто зазначити, що важливу роль в зростанні рівня експресії

генів відіграє час. Найвищі показники флуоресценції GFP були отримані на 12 день після інфільтрації у ділянках інфільтрованих агробактеріальною суспензією із векторними конструкціями PУ2 та PУ5. Трохи гірший ефект спостерігали у ділянках, що містили P90. Там пік інтенсивності флуоресценції спостерігали на 7 день після інфільтрації, однак до закінчення експерименту її рівень різко падав. Це можна пояснити будовою векторної конструкції, вона не містила жодних додаткових елементів, окрім гена *gfp*.

Останнім фактором, що впливав на рівень експресії гена *gfp* була концентрація введеної агробактеріальної суспензії. Відповідно до результатів, чим вища концентрація суспензії була введена на ділянці листка – тим вищий рівень експресії гена *gfp* спостерігали. Ймовірно, це пов'язано з тим, що в такому разі у клітинах рослин утворюється більша кількість мРНК, що в свою чергу приводить до збільшення кількості рекомбінантного білка всередині рослинних тканин.

Перевіряючи ефективність наданих векторних конструкції встановили позитивний ефект інгібітору посттранскрипційного сайленсингу р19 на рівень експресії гена *gfp* та доцільність його використання у інших експериментах, що стосуються продукування рекомбінантних білків у рослинних системах. Векторна система з елементами вірусного геному PУ2 також загалом показала стабільні показники експресії гена *gfp*.

Також рівень експресії гена *gfp* було порівняно з літературними даними отриманими у експериментах з двома іншими представниками роду *Nicotiana* – *Nicotiana tabacum* [22] і *Nicotiana benthamiana* [55]. За результатами порівнянь махорка *N. rustica* володіє подібними характеристиками, що й два інших види, також, рівень експресії гена *gfp* у її листках залишається високим достатньо довго, що вказує на те, що махорку *N. rustica* можна використовувати як платформу для удосконалення векторних конструкції, а також для виробництва рекомбінантних білків.

ВИСНОВКИ

1) Встановлено, що порівняно з *N. tabacum* та *N. benthamiana*, *N. rustica* має більшу біомасу, тому є перспективною платформою для продукування рекомбінантних білків.

2) Наявність у векторній системі інгібітора посттранскрипційного сайленсингу генів p19 значно підвищує рівень експресії та її стабільність.

3) У зрілих листках та у листках з більшою масою рівень експресії вищий, особливо різниця спостерігалася під час піку інтенсивності флуоресценції, на 12 день після інфільтрації.

4) Рівень експресії зростає зі збільшенням концентрації введеної агробактеріальної суспензії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Xu J, Dolan MC, Medrano G, Cramer CL, Weathers PJ. Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2012;30(5):1171–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.020>
2. Matsuda R, Abe T, Fujiwara K. Viral vector-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*: effects of light source on leaf temperature and hemagglutinin content. *Plant Cell Rep*. 2017;36(10):1667–9.
3. Malabadi RB, Chalannavar RK, Meti NT, Vijayakumar S, Mulgund GS. Plant Viral Expression Vectors and Agroinfiltration : A Literature Review Update. *Rsis*. 2016;III(Iv):32–6.
4. Shah KH, Almaghrabi B, Bohlmann H. Comparison of Expression Vectors for Transient Expression of Recombinant Proteins in Plants. *Plant Mol Biol Report*. 2013;31(6):1529–38.
5. Zhang X-F, Xie Y, Wang H, Wang J, Chen H, Zeng T, et al. Exploration of an Actin Promoter-Based Transient Expression Vector to Trace the Cellular Localization of Nucleorhabdovirus Proteins in Leafhopper Cultured Cells. *Front Microbiol*. 2018;9(December):1–12.
6. Sheen H, White KA. Expression of T7-based constructs in tobacco cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2018;499(2):196–201. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.123>
7. Yamamoto T, Hoshikawa K, Ezura K, Okazawa R, Fujita S, Takaoka M, et al. Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23024-y>
8. Mohammadzadeh S, Roohvand F, Memarnejadian A, Jafari A, Ajdary S, Salmanian AH, et al. Co-expression of hepatitis C virus polytope-HBsAg and p19-silencing suppressor protein in tobacco leaves. *Pharm Biol*. 2016;54(3):465–73.
9. Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, Doskocilova A, Komis G, Samaj J.

- Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2015;33(6):1024–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>
10. Кіщенко ОМ, Петерсон АА, Василенко МЮ, Кучук МВ. ТРАНЗИЄНТНА ЕКСПРЕСІЯ GFP У КУЛЬТУРІ РОСЛИННИХ ТКАНИН IN VITRO ЗА ВИКОРИСТАННЯ МОДУЛЬНОЇ СИСТЕМИ ВІРУСНИХ ВЕКТОРІВ. 2017;198–201.
 11. Jailani AAK, Solanki V, Roy A, Sivasudha T, Mandal B. A CGMMV genome-replicon vector with partial sequences of coat protein gene efficiently expresses GFP in *Nicotiana benthamiana*. *Virus Res*. 2017;233(March):77–85.
 12. Mardanov ES, Blokhina EA, Tsybalova LM, Peyret H, Lomonosoff GP, Ravin N V. 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;8(February):1–8.
 13. Boyer JC, Haenni AL. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. Vol. 198, *Virology*. 1994. p. 415–26.
 14. Rozov SM, Deineko E V. Strategies for Optimizing Recombinant Protein Synthesis in Plant Cells: Classical Approaches and New Directions. *Mol Biol*. 2019;53(2):157–75.
 15. Kim Y, Lee G, Jeon E, Sohn EJ, Lee Y, Kang H, et al. The immediate upstream region of the 5'-UTR from the AUG start codon has a pronounced effect on the translational efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(1):485–98.
 16. Chen Q, Lai H. Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Hum Vaccines Immunother*. 2013;9(1):26–49.
 17. Gleba Y., Tuse D, Giritch A. Plant Viral Vectors for Delivery by *Agrobacterium*. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2013;375(October):155–92. Available from:

- http://books.google.com/books?id=_DDwCqx6wpcC&printsec=frontcover&dq=unwritten+rules+of+phd+research&hl=&cd=1&source=gbs_api%255Cn papers2://publication/uuid/48967E01-55F9-4397-B941-310D9C5405FA%255Cnhttp://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf%255
18. Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and Maintenance of Virus-Induced Gene Silencing Gene Silencing by Potato Virus X Vectors with. 1998;10(June):937–46.
 19. Lacomme C, Chapman S. Use of Potato Virus X (PVX)– Based Vectors for Gene Expression and Virus-Induced Gene Silencing (VIGS). 2008;(February):1–13.
 20. Maharjan PM, Choe S. Transient expression of hemagglutinin antigen from canine influenza virus h3n2 in nicotiana benthamiana and lactuca sativa. Clin Exp Vaccine Res. 2019;8(2):124–31.
 21. Kosobokova EN, Piniugina M V., Kosorukov VS. Synthesis of biologically active human interferon α -2b in Nicotiana benthamiana. Appl Biochem Microbiol. 2016;52(7):705–13.
 22. Modarresi M, Jalali-Javaran M, Shams-Bakhsh M, Zeinali S, Mirzaee M. TuMV as an efficient transient vector for expressing heterologous proteins in Nicotiana tabacum and n. Benthamiana. Adv Hortic Sci. 2019;33(2):257–62.
 23. Dirisala VR, Nair RR, Srirama K, Reddy PN, Rao KRSS, Satya Sampath Kumar N, et al. Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming. Acta Physiol Plant. 2017;39(1).
 24. Wagner B, Fuchs H, Adhami F, Ma Y, Scheiner O, Breiteneder H. Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in Nicotiana benthamiana. Methods. 2004;32(3):227–34.
 25. Huang TK, Falk BW, Dandekar AM, McDonald KA. Enhancement of recombinant protein production in transgenic Nicotiana benthamiana plant cell suspension cultures with co-cultivation of Agrobacterium containing

- silencing suppressors. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):21–5.
26. Tahmasebi AA, Afsharifar A. Cap analog and Potato virus A HC-Pro silencing suppressor improve GFP transient expression using an infectious virus vector in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Biol Res Commun.* 2017;6(2):45–56.
 27. Naji-talakar S. Plant-derived Biopharmaceuticals : Overview and Success of Agroinfiltration. *Trends in Capstone.* 2017;2(1):1–12.
 28. Peyret H, Brown JKM, Lomonossoff GP. Improving plant transient expression through the rational design of synthetic 5' and 3' untranslated regions. *Plant Methods [Internet].* 2019;15(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0494-9>
 29. Lacroix B, Citovsky V. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Int J Dev Biol.* 2013;57(6–8):467–81.
 30. Chumakov MI. Protein apparatus for horizontal transfer of *agrobacterium* T-DNA to eukaryotic cells. *Biochemistry (Mosc).* 2013 Dec;78(12):1321–32.
 31. Naseri Z, Khezri G, Davarpanah SJ, Ofoghi H. Virus-based vectors: A new approach for the production of recombinant proteins. *J Appl Biotechnol Reports.* 2019;6(1):6–14.
 32. Sheludko Y V. *Agrobacterium*-Mediated Transient Expression: a Perspective Approach for High-Scale Production of Recombinant Proteins in Plants. *Nauk ta innovacii.* 2006;2(6):65–76.
 33. Ghim C, Lee SK, Takayama S, Mitchell RJ. The art of reporter proteins in science : past , present and future applications. 2010;(July).
 34. Chudakov DM, Matz M V., Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev.* 2010;90(3):1103–63.
 35. Parveez GKA, Majid NA. Green fluorescent protein as a visual selection marker for oil palm transformation. *Ind Crops Prod [Internet].* 2018;115(August 2017):134–45. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.016>
36. Schneider AFL, Hackenberger CPR. Fluorescent labelling in living cells. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2017;48:61–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.012>
 37. Harper BK, Mabon SA, Leffel SM, Halfhill MD, Richards HA, Moyer KA, et al. Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. *Nat Biotechnol*. 1999;17:1125–9.
 38. LMU. Creation, Expression, Purification and Characterization of GFP. 2017; Available from: https://www.biophysik.physik.uni-muenchen.de/teaching/laboratory_courses/gfp_expression/g4b_gfp_expressionenglish_2017.pdf
 39. Arévalo-Gallegos S, Varela-Rodríguez H, Lugo-Aguilar H, Siqueiros-Cendón TS, Iglesias-Figueroa BF, Espinoza-Sánchez EA, et al. Transient expression of a green fluorescent protein in tobacco and maize chloroplast. *Electron J Biotechnol* [Internet]. 2020;45:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.01.008>
 40. Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, Matz M V., Remington SJ. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(2):462–7.
 41. Opiasa RD, Damasco OP, Laude TP, Laurena AC, Laude RP. Transient expression of red fluorescent protein gene from *Discosoma* sp. in calli and immature embryos of different maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Philipp J Crop Sci*. 2018;43(3):10–20.
 42. Sun L, Alariqi M, Zhu Y, Li J, Li Z, Wang Q, et al. Red fluorescent protein (DsRed2), an ideal reporter for cotton genetic transformation and molecular breeding. *Crop J* [Internet]. 2018;6(4):366–76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.05.002>
 43. Divéki Z, Salánki K, Balázs E. Limited utility of blue fluorescent protein (BFP) in monitoring plant virus movement. *Biochimie*. 2002;84(10):997–1002.

44. Chen Q, Santi L, Zhang C. *Plant-Made Biologics*. 2014;2014:10–3.
45. Bidarigh fard A, Dehghan Nayeri F, Habibi Anbuhi M. Transient expression of etanercept therapeutic protein in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;130:483–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.153>
46. Farsad AS, Malekzadeh-Shafaroudi S, Moshtaghi N, Fotouhi F, Zibae S. Transient expression of HA1 antigen of H5N1 Influenza virus in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) via agro-infiltration. *J Agric Sci Technol*. 2017;19(2):439–51.
47. Park Y, An DJ, Choe SE, Lee Y, Park M, Park S, et al. Development of recombinant protein-based vaccine against classical swine fever virus in pigs using transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci*. 2019;10(May):1–16.
48. Marques LÉC, Silva BB, Dutra RF, Florean EOPT, Menassa R, Guedes MIF. Transient Expression of Dengue Virus NS1 Antigen in *Nicotiana benthamiana* for Use as a Diagnostic Antigen. *Front Plant Sci*. 2020;10(January):1–12.
49. Alkanaimsh S, Karuppanan K, Guerrero A, Tu AM, Hashimoto B, Hwang MS, et al. Transient expression of tetrameric recombinant human butyrylcholinesterase in *nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci*. 2016;7(JUNE2016):1–13.
50. Sindarovska YR, Olevinskaya ZM, Demchenko OA, Spivak NY, Kuchuk N V. *Nicotiana cavicola* as a host for production of recombinant proteins by agrobacterium-mediated transient gene expression. *Biopolym Cell*. 2019;35(5):340–8.
51. Norkunas K, Harding R, Dale J, Dugdale B. Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods* [Internet]. 2018;14(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0343-2>
52. Зубова НН, Булавина АЮ, Савицкий АП. Спектральные и физико-

- химические свойства зеленого (GFP) и красного (drFP583) флуоресцирующих белков. Успехи Биологической Химии. 2003;43:163–224.
53. Sukenik SC, Karuppanan K, Li Q, Lebrilla CB, Nandi S, McDonald KA. Transient recombinant protein production in glycoengineered *Nicotiana benthamiana* cell suspension culture. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):1–14.
54. Garabagi F, Gilbert E, Loos A, Mclean MD, Hall JC. Utility of the P19 suppressor of gene-silencing protein for production of therapeutic antibodies in *Nicotiana* expression hosts. *Plant Biotechnol J*. 2012;10(9):1118–28.
55. Wydro M, Kozubek E, Lehmann P. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochim Pol*. 2006;53(2):289–98.