

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

01.09 – КР. 1998 “С” 12.11.24 012 ПЗ

Герасименка Арсенія Сергійовича

2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ

І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнології та екології

УДК 604.3:633

ПОГОДЖЕНО
Декан факультету
захисту рослин, біотехнологій та
екології

_____ Коломієць
Ю.В.

« ____ » _____ 2024 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри
фізіології, біохімії рослин та
біоенергетики

_____ Прилуцька С.В.

« ____ » _____ 2024 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «Біосинтез в рослинах рекомбінантного коліцину М та його антибактеріальна активність»

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

д.с-г.н., професор

(підпис)

Лісовий М.М.

Керівник кваліфікаційної роботи

д.б.н., професор

(підпис)

Прилуцька С.В.

Виконав

(підпис)

Герасименко А.С.,

КИЇВ – 2024

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

**Завідувач кафедри фізіології,
біохімії рослин та біоенергетики**

_____ **Прилуцька С.В.**

“ _____ ” _____ **2024 р.**

ЗАВДАННЯ ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

_____ **Герасименко Арсеній Сергійович**

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Біосинтез в рослинах рекомбінантного коліцину М та його антибактеріальна активність»

затверджена наказом ректора НУБіП України від “11” листопада 2024р. № 1998С

керівник роботи _____ **д.б.н., проф. Прилуцька Світлана Володимирівна**

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

2. Строк подання студентом роботи 20 травня 2024 року

3. Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Провести аналіз літературних даних про біосинтез рекомбінатних білків в трансгенних рослинах.
2. Провести аналіз літературних даних відносно трансгенезу рослин
3. Провести генетичну трансформацію *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica* вектором, що містить ген коліцину M.
4. Оцінити ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин.
4. Провести молекулярно-біологічні дослідження трансформованих *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica*
5. Провести оцінку частоти передачі рекомбінантних генів у першому поколінні.

Перелік графічного матеріалу (за потреби)

Дата видачі завдання “1” вересня 2023р.

Завдання прийняв до виконання _____ Герасименко А.С.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____ Прилуцька С.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Магістерська кваліфікаційна робота «Біосинтез в рослинах рекомбінантного коліцину М та його антибактеріальна активність» виконана у навчально-науковій лабораторії відділу генетичної інженерії Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України та представлена в обсязі 71 сторінок формату А4, містить 6 таблиць, 24 рисунків, 97 використаних джерел, і складається з таких розділів:

- Вступ
- Огляд літератури
- Матеріали і методи
- Результати та їх обговорення
- Висновки
- Список використаних джерел

Актуальність теми: в зв'язку з кризою стійкості до антибіотиків, необхідно знаходити нові методи лікування та профілактики супербактерій та бактерій з мультирезистентністю. Для запобігання спалахам кишкових інфекцій в харчовій промисловості активно застосовують антибіотики для боротьби з такими патогенами, як *Campylobacter spp*, *Escherihia coli* та *Salmonella spp*. Новим методом терапії може стати застосування коліцину М, це антибактеріальний пептид, який в природі продукується кишковою паличкою з вузькоспеціалізованим спектром дії. Ця сполука ефективно елімінує інші штами *E. coli*. Крім того, дану сполуку можна отримувати в рослинних системах експресії, вже опубліковані дослідження, в яких за допомогою генетичної інженерії модифікували томати та тютюн. Важливо зазначити, що Управління з продовольства і медикаментів США перевірили вплив на людський та тваринний організм і не виявило шкідливого впливу, таким чином коліцини повністю безпечні для вживання

В кваліфікаційній роботі досліджено можливість конститутивного біосинтезу коліцину М модифікованих рослинах, таких як *Lactuca sativa* та

Brassica rapa var. Niposinica. Ці рослини потенційно можна буде вживати в сирому вигляді або додавати до раціону тварин, тим самим запобігати інфекціям та епідеміям. В світовій практиці обмаль подібних досліджень, що робить тему роботи актуальною .

Мета роботи: отримати генетично трансформовані за допомогою вектору pCB052 лінії *Lactuca sativa* та *Brassica rapa var. Niposinica*, котрі через біосинтез рекомбінантного коліцину М проявляють антибактеріальну активність.

Об'єкт дослідження: трансформовані *Lactuca sativa* та *Brassica rapa var. Niposinica* , що синтезують рекомбінантний білок коліцин М

Предмет дослідження: *Lactuca sativa* сорту «Одеський кучерявий», *Brassica rapa var. Niposinica* сорту «Високоврожайний», вектор pCB052, *Agrobacterium tumefaciens* штаму AGL1, *Escherichia coli* штаму DH5a.

Методи дослідження: методи культивування *in vitro*, спектрофлуориметричний метод, молекулярно-генетичні методи (ПЛР, електрофорез), метод Кірбі-Бауера, спот-тест.

Ключові слова: рекомбінантний білок, коліцин М, генетична трансформація.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1 Експресійні системи для синтезу рекомбінантних білків.....	10
1.2 Рослинні експресійні системи для виробництва цінних фармацевтичних білків	11
1.3 Стабільна експресія білків за допомогою <i>Agrobacterium</i> - опосередкованої трансформації.....	15
1.4 Оптимізація пост-трансляційних модифікацій.....	16
1.5 Розробка терапевтичних білків на основі рослинних систем експресії.....	17
1.6 Створення експресійних касет для генетичної інженерії	19
1.7 Методи перенесення векторів в рослинний геном	20
1.8 Селекція трансгенних рослин.....	22
1.9 Експресія трансгенів в залежності від розташування в геному	23
1.10 Нормативні процедури для тестування та затвердження ГМ- культур.....	25
1.11 Коліцини – огляд та характеристика	26
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	29
2.1 Вибір та загальний опис об'єкту дослідження.....	29
2.2 Хімічні речовини та обладнання	29
2.3 Опис векторної системи для трансформації	32
2.4 Характеристика штаму <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
2.4.1 Характеристика штаму <i>Escherichia coli</i> DH5a	34

2.3	Особливості введення <i>Lactuca sativa</i> та <i>Brassica rapa</i> var. <i>niposinica</i> в культуру <i>in vitro</i>	36
2.4	Виділення ДНК з рослинного матеріалу	37
2.5	ПЛР аналіз виділеної ДНК.....	39
2.6	Аналіз ампіконів за допомогою гел-електрофорезу.....	40
2.7	Отримання витяжки з трансформованих рослин.....	41
2.8	Перевірка біологічної активності екстрактів	42
	РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	43
3.1	<i>Lactuca sativa</i> та <i>Brassica rapa</i> var. <i>niposinica</i> в культурі <i>in vitro</i>	43
3.2	Трансгенез <i>Lactuca sativa</i> та <i>Brassica rapa</i> var. <i>niposinica</i>	46
3.3	Молекулярно-генетичне дослідження трансформованих рослин	51
3.4	Бактеріостатична дія рослинних екстрактів	53
3.5	Трансгени та трансгенні ознаки у наступному поколінні трансформованих рослин <i>Lactuca sativa</i>	55
3.6	Трансгени та трансгенні ознаки у наступному поколінні трансформованих рослин <i>Brassica rapa</i> var. <i>niposinica</i>	56
	Список використаних джерел.....	59
	ДОДАТОК.....	71
	АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ БАКАЛАВРСЬКОЇ РОБОТИ.....	71

ВСТУП

Активне використання антибіотиків в різних сферах людської діяльності викликає безліч проблем для екології, медицини та інших сфер. Одна з найбільших це супербактерії та мультирезистентні бактерії. Інфекції викликані подібними збудниками важко піддаються лікуванню і призводять до великої кількості смертей, дана тенденція стимулює попит на створення нових шляхів протидії цій небезпеці. Наприклад, бактерицини та бактериостатини, можуть бути використанні як повноцінні замітники антибіотиків в певних випадках. Одним з таких вважають коліцин М, його було відкрито при дослідженні ентеробактерій, а саме їх антибактеріальних пептидів та білків, які вони синтезують для пригнічення своїх конкурентів [1].

У 2021 році було задокументовано приблизно 4,7 мільйона летальних випадків викликаних мультирезистентними до антибіотиків штамми бактерій. Антимікробні препарати широко використовуються в усьому світі для лікування інфекцій. Неправильне використання антибіотиків призвело до стійкості до антибіотиків (AMR), що призводить до небезпечних супербактерій, зокрема метицилін-резистентний золотистий стафілокок (MRSA) та стійкого до ліків туберкульозу. Стійкі до антибіотиків бактерії є важливою глобальною проблемою охорони здоров'я, вони можуть стати причиною 39 мільйонів смертей до 2050 року та бути пов'язані ще з 169 мільйонами [2].

Така ситуація складається через повсюдне та надмірне застосування антибіотиків, необхідно передивитись їх використання та знаходити альтернативи. Наприклад, коліцин М можна використовувати в харчовому секторі, так прецеденти вже існують, він вже був визнаний Управлінням продовольства і медикаментів США та допущений до вживання людини. Широке введення в застосунок в харчовій промисловості може значно знизити спалахи інфекцій без використання антибіотиків [3].

Немаловажливим є спосіб отримання коліцину М, наразі його можливо синтезувати в промислових масштабах за допомогою рослинного біофармінгу. Вже відомі дослідження по транз'єнтному синтезу в тютюні Бентхама [4]. Отриманий рослинним біосинтезом коліцин М, можна буде застосовувати у вигляді ліофілізованого порошку або шляхом споживання рослин.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Експресійні системи для синтезу рекомбінантних білків

Існують механізми, які дозволяють синтезувати, модифікувати та регулювати білки в живих організмах. Організми-господарі або клітинні лінії, такі як клітини бактерій, дріжджів, комах або ссавців, можна використовувати в процесі отримання нового штаму того самого штаму того самого штаму того самого штаму іншого штаму той самий штаму того самого штаму Кожна система має свої особливості та переваги.

Введення гена в клітинну лінію є першим кроком у процесі експресії. Цільовий ген зазвичай міститься в конструкції рекомбінантної ДНК з регуляторними елементами для контролю його експресії. Елементи забезпечують транскрибування та синтез генів.

Після введення гена його гени копіюються в іншу форму. Коли рибосоми збирають амінокислоти в порядку, визначеному генетичним кодом, утворюється потрібний білок.

Посттрансляційні модифікації, фосфорилування, глікозилювання або протеолітичне розщеплення є деякими з механізмів, які підвищують стабільність, функцію або точне розташування системи експресії в клітині [5].

Складність білка, потреба в посттрансляційних модифікаціях, масштаб виробництва та область застосування є одними з факторів, які впливають на систему експресії. Можливість виконувати певні модифікації є однією з переваг кожної системи [6].

Транскрипція у прокариотів і еукаріотів проходить у три основні стадії: ініціація, елонгація і термінація. На першому етапі дволанцюгова ДНК розкручується, щоб РНК-полімераза могла приєднатися до неї та розпочати процес транскрипції. Після цього фермент продовжує роботу з синтезу мРНК, регульовану активаторами, репресорами та у випадку еукаріотів — структурою хроматину. Відмінність між прокариотами та еукаріотами полягає в тому, що у прокариотів мРНК не потребує модифікацій і може одразу

використовуватися для трансляції. У еукаріотів же мРНК піддається додатковим змінам: видаляються інтрони (сплайсинг), додається ковпачок на 5'-кінці та полі-А хвіст на 3'-кінці, після чого мРНК переміщується в цитоплазму для трансляції [7].

Трансляція, або синтез білка, є багатоступеневим процесом, що вимагає участі рибосом, тРНК, мРНК та білкових факторів, а також амінокислот, АТФ, ГТФ і кофакторів. Цей процес у прокариотів і еукаріотів має спільні риси, хоч і відрізняється певними деталями.

На стадії ініціації трансляції мала субодиниця рибосоми, зв'язана з ініціаторною тРНК, приєднується до мРНК, скануючи її з 5'-кінця до старт-кодону (AUG). Після зв'язування з ініціаторним кодоном до малої субодиниці приєднується велика субодиниця рибосоми, формуючи ініціаційний комплекс. У стадії елонгації тРНК доставляють амінокислоти до рибосоми, де вони поєднуються у поліпептид відповідно до послідовності мРНК. На стадії термінації поліпептид вивільняється, коли рибосома досягає стоп-кодону, завершуючи трансляцію [8].

1.2 Рослинні експресійні системи для виробництва цінних фармацевтичних білків

Перші згадки про отримання білків ссавців у рослинах з'явилися ще в кінці 1980-х років, коли концепція «молекулярного рослинного фермерства» почала означати використання рослин як біологічних фабрик. Введене Фішером та іншими, поняття «молекулярного фермерства» або «біофармінгу» описує процес виробництва рекомбінантних білків у рослинах [9]. На ранніх етапах увага галузі була зосереджена на рекомбінантних макромолекулах, таких як білки крові, вакцини та антитіла, а також на сировині для косметичної та медичної промисловості. Даний огляд головним чином зосереджується на біофармацевтичних продуктах, таких як антигени, антитіла і промислові ферменти [10].

Звичайні платформи для великомасштабного виробництва біофармацевтичних препаратів, такі як кишкова паличка, дріжджі, а також клітинні системи комах і ссавців, були відпрацьовані й постійно вдосконалюються. Вибір платформи залежить не тільки від дослідницьких цілей, але і від призначення та функції потрібних біопрепаратів. Складні білки, що потребують правильного згортання для досягнення біологічної активності, зазвичай виробляються у дріжджах або клітинах ссавців, оскільки прокаріотичні системи не здатні забезпечити необхідний рівень складності. Однією з головних проблем клітин ссавців є високі витрати на масштабування виробництва і ризик зараження вірусами тваринного походження. Зважаючи на це, рослинні системи стають привабливою альтернативою для виробництва окремих білків [11].

Сьогодні рослинні системи експресії широко використовуються для масового виробництва цінних білків і метаболітів, що знаходять застосування у фармацевтичній, нутрицевтичній та косметичній галузях. Ці платформи є економічно вигідними, вільними від патогенів, що загрожують здоров'ю людини, та здатними синтезувати складні білки з посттрансляційними модифікаціями, що робить їх масштабованими [12]. Рослинні системи можна використовувати для виробництва вакцин, антитіл, антимікробних пептидів, гормонів, факторів росту і ферментів, що мають промислове значення.

Крім того, рослини є джерелом цінних вторинних метаболітів (ВМ), що утворюються з первинних метаболічних шляхів і синтезуються обмежено під час росту, розвитку або під дією абіотичних та біотичних факторів [13]. ВМ мають широкий спектр дії проти вірусних, бактеріальних і грибкових інфекцій, а також використовуються для лікування різних захворювань, таких як рак, артрит, діабет, неврологічні та респіраторні розлади [14]. Через складність і високу вартість хімічного синтезу багатьох ВМ, фармацевтична промисловість покладається на лікарські рослини як надійне джерело цих метаболітів [15].

Розвиток молекулярних методів і технологій синтетичної біології дозволив суттєво покращити кількість та якість рослинних рекомбінантних білків і ВМ. У цьому огляді представлені ключові стратегії, спрямовані на підвищення ефективності виробництва цінних білків і метаболітів з використанням рослин як біофабрик для гетерологічної експресії.

Молекулярне рослинництво — це підхід, який використовує рослини як платформи для отримання високовартісних рекомбінантних пептидів і білків. Такі білки можна синтезувати як стабільно, так і тимчасово, накопичуючи їх у різних частинах рослин: у листі, насінні, хлоропластах, плодах або коренях [16].

Існують численні методи трансформації рослин, серед яких найбільш поширеними є трансформація з використанням агробактерій, поліетиленгліколю (ПЕГ), бомбардування частинками, вакуумна інфільтрація та методи на основі вірусів [17].

Промотори відіграють ключову роль у регуляції експресії трансгенів, і для досягнення оптимальної експресії використовуються різні їх типи, такі як конститутивні, індукцйбельні, тканинно-специфічні та синтетичні. Потужний конститутивний промотор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV 35S), що застосовується в одній або декількох копіях, широко використовується в дводольних рослинах. Водночас для експресії терапевтичних білків у однодольних рослинах використовують промотор убіквітину-1 (Ubi-1) кукурудзи [18].

Нещодавно дослідження продемонструвало, що комбінаторна стекована промоторна система може значно підвищити експресію рекомбінантного бичачого лізоциму (BvLz) — потужного антимікробного ферменту, який знаходить застосування в харчовій, косметичній та сільськогосподарській промисловості [19]. За допомогою комбінованої трансформації та коекспресії BvLz під контролем різних конститутивних і бульбочкових промоторів у

цукровій тростині вдалося досягти високих рівнів експресії (до 11,5% від загального розчинного білка) [20].

Аналогічно, було успішно підвищили експресію рекомбінантного аглютиніну підсніжника (GNA) у цукровій і енергетичній тростині. GNA відомий своїми противірусними, протигрибковими та протипухлинними властивостями. Під дією одного конститутивного промотора Ubi-1 GNA досягала 0,04% і 0,3% загального розчинного білка (TSP) в бульбах і листках цукрової тростини відповідно. Подальша коекспресія GNA з використанням кількох промоторів, таких як rUbi-1 і промотори, регульовані бульбою (*dirigent5-1* і вірусу цукрової тростини), підвищила рівень експресії до 1,8% TSP і 2,3% TSP у різних лініях тростини. Додаткове стимулювання промотора саліциловою кислотою в трансгенних лініях з потрійним промотором (pUBD5) дозволило підвищити експресію GNA до 2,7% TSP [21].

Ці дослідження показують великий потенціал індукованих промоторів та комбінованою стекованою промоторною системою для підвищення виробництва корисних терапевтичних білків у рослин, що відкривають нові перспективи для біотехнологій [21].

Ефективне використання кодонів нативних амінокислот може покращити вираження білка шляхом оптимізацій несприятливих кодонів у генетичному коду. Деякі молекули РНК мають приховані сайти сплайсингу, вторинну структуру або елементи стабільності та альтернативні сайти початку трансляційного процесу. Це може негативно позначитися на трансляційному процесі та синтезу білка. Змога оптимізувати кодони дозволяють використовувати синонімічні кодони без зміни послідовності амінокислот для покращення ефективності трансляції [22]. Наприклад, удосконалення кодонів призвело до збільшення виразності фактора стовбурових клітин (SCF), необхідного для виробництва еритроцитів *ex vivo* на 25–30 разів у клітинах тютюну Bright Yellow-2 (BY-2) [23].

1.3 Стабільна експресія білків за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації

Серед переваг «стабільної» трансгенної рослинної системи – високий потенціал масштабування та унікальна здатність до глікозилювання білків. Для отримання рекомбінантних білків у стабільній системі експресії застосовуються різні види рослин, включаючи тютюн, рис, картоплю, помідори, салат та латук. Ці рослини можна розділити на листові та насінні. Листові рослини, такі як салат, є ефективними платформами для отримання білків із середнім рівнем експресії: вихід становить 0,24% і 0,13% відповідно [24,25]. Листові нехарчові культури, такі як тютюн з низьким вмістом нікотину та алкалоїдів, а також люцерна, також є привабливими господарями завдяки високій продуктивності біомаси [26].

Для отримання білків також використовують органи зберігання і насіння, наприклад, рис, кукурудзу і картоплю. Ці платформи економічно вигідні, адже забезпечують стабільне довгострокове зберігання білків, а процес екстракції та очищення білків легко поєднується з аграрним виробництвом [27]. До того ж насіння містить менше фенольних сполук, які можуть погіршити якість смоли під час очищення. Наприклад, за допомогою трансформації рису можна отримати синтетичні людські лактоферин та лізоцим із вмістом білка 0,5% та 0,6% відповідно [28]. Крім насінних рослин, рослини з високим вмістом води (помідори, салат) є перспективними для молекулярного фермерства, адже білки легше екстрагуються з їхніх тканин [29]. Так, тимозин-а1 можна виділити з помідорів з виходом до 6 мкг/г сирової маси [30].

Трансгенні рослини, які виробляють рекомбінантні білки, створюються за допомогою ядерної або пластидної трансформації. Більшість досліджень використовують ядерну трансформацію, але експресія білків у хлоропластах дає ще вищий рівень експресії (до 72% загального білка) і забезпечує стабільність та можливість вирощування у відкритих умовах завдяки материнському спадкуванню [31,32]. На основі пластид розроблено вакцини

проти різних інфекцій, зокрема для запобігання туберкульозу, холери, сибірки, чуми та поліомієліту [33,35]. Однак трансформація хлоропластів можлива лише для обмеженої кількості рослин, таких як салат [36], і тому вимагає подальших досліджень для досягнення комерційного застосування.

Особлива перевага їстівних трансгенних рослин полягає в можливості безпечного перорального застосування. Така форма введення може стимулювати імунітет слизової оболонки. Наприклад, у 2005 році Танавала та ін. дослідили пероральну вакцину проти HBsAg з картоплі, довівши її ефективність для імунізації [37]. Для пероральних вакцин важливим є мукозний імунітет; прикладом є Mucorice-CTV і Mucorice-ARP1 – вакцини, які накопичуються в органах зберігання рису і захищають від захворювань, індуючи як слизовий, так і системний імунітет [38,39].

Незважаючи на переваги, у застосуванні рослин для пероральних рекомбінантних білків є труднощі, такі як контроль дозування. Зокрема, Protalix Co. використовує ліофілізовані клітини моркви для отримання глюкоцереброзидази, а Interberry вводить анти-ФНП з висушеної полуниці в корм для собак [40].

Трансгенні рослинні системи мають перспективи, але також стикаються з економічними викликами, які визначають інвестиційний інтерес. Задля розширення виробництва більшість платформ зараз переходить на транзійтні системи експресії, що полегшують масштабування біомаси рослин із цільовими білками.

1.4 Оптимізація пост-трансляційних модифікацій

Глікозилювання є однією з ключових посттрансляційних модифікацій, необхідних для ефективності багатьох терапевтичних білків людини. Проте глікозилювання у рослинах має відмінності від людського, зокрема, включає додаткові модифікації α 1,3-фукозою та β 1,2-ксилозою, що може впливати на активність, стабільність і можливі імунні реакції на терапевтичний білок [41]. У зв'язку з цим були створені трансгенні рослини та культури клітин рослин,

у яких рослинні глікани замінено на людські шляхи глікозилування, щоб отримувати більш складні білки, такі як моноклональні антитіла [42].

Наприклад, антитіла CAP256-VRC26 проти вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ-1) були успішно експресовані в глікоінженерній *Nicotiana benthamiana* і продемонстрували нейтралізуючу активність, аналогічну антитілам, отриманим у ссавців [43]. Подібним чином, людський гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (Г-КСФ) з людським типом О-глікозилування був отриманий у *N. benthamiana* шляхом коекспресії необхідних для цього генів [44].

1.5 Розробка терапевтичних білків на основі рослинних систем експресії

Рослинні системи виробництва все частіше використовуються для синтезу важливих терапевтичних білків, вакцин і моноклональних антитіл. Частина цих біопрепаратів вже комерціалізована або проходить клінічні випробування (Таблиця 1.1). Першим затвердженим Управлінням з контролю за продуктами і ліками США (FDA) препаратом рослинного походження став Elvelyo (таліглуцераза альфа), розроблений компанією Protalix Biotherapeutics для лікування хвороби Гоше I типу з використанням генетично модифікованих клітин моркви [45]. Іншим прикладом є ZMapp — коктейль із трьох моноклональних антитіл, виготовлених у трансгенному тютюні, який ефективно вилікував макак-резусів від вірусу Ебола [46]. Серед інших комерційних білків рослинного походження — бичачий трипсин (отриманий з кукурудзи та доступний через Sigma Aldrich), фактори росту людини й тварин (синтезовані у насінні ячменю компанією ORF Genetics) та рекомбінантний людський сироватковий альбумін (вироблений у рисі та реалізований ScienCell Research Laboratories). Нещодавно у 3-й фазі клінічних випробувань була отримана квадривалентна вакцина проти грипу на основі *N. benthamiana*, яка продемонструвала значний захист від грипу у дорослих [47]. Ці досягнення підкреслюють потенціал рослинних платформ у виробництві

біофармацевтичних препаратів, хоча для їх широкого впровадження ще необхідні додаткові дослідження та оптимізація (табл. 1).

Таблиця 1.1

Терапевтичних білки на основі рослинних систем експресії

Продукт	Рослина	Стадія розробки	Призначення
Вакуцина проти бактерій <i>Bacillus anthracis</i>	N. benthamiana	Фаза 1	Захист від сибірки
Вакуцина проти холери <i>Vibrio cholerae</i>	Рис	Фаза 1	Захист від холери
COVID-19 вакцина	N. benthamiana	Фаза 3	Захист від COVID-19
Фьюзійний білок TNF (OPRX-106)	Клітини тютюну BY2	Фаза 2а	Лікування виразкового коліту
Моноклональні антитіла проти ВІЛ та герпесу	N. benthamiana	Фаза 1	Захист від ВІЛ-1, ГСВ-1 та ГСВ-2
Пегунілгальдаза альфа (пегільований α - галактозидаза А)	Система ProCellEx	Фаза 1/2	Лікування хвороби Фабрі
Марр (триклональне антитіло)	N. benthamiana	Фаза 1	Лікування вірусу Ебола
Вакцина проти малярії <i>Plasmodium falciparum</i>	N. benthamiana	Фаза 1	Захист від малярії
Таліглуцераза альфа	Клітини моркви	Фаза 3	Лікування хвороби Гоше
Нейтралізуюче антитіло до ВІЛ	N. tabacum	Фаза 1	Захист від ВІЛ

Вакуцина проти фолікулярної лімфоми В-клітин	N. benthamiana	Фаза 1	Лікування неходжкінської лімфоми
Людська ацетилхолінестераза-R (PRX-105)	Клітинна лінія N. tabacum	Фаза 1	Лікування отруєння органічними фосфатами (ОФ)

1.6 Створення експресійних касет для генетичної інженерії

Створення трансгенних рослин починається з розробки генних експресійних касет, що включають промотори та кодуючі послідовності, вибору ДНК-векторів та відповідного методу трансформації для цільових тканин, а також оптимізації методів селекції та регенерації. Успіх трансформації залежить від налаштування касет для забезпечення необхідного або оптимального рівня експресії трансгенів у певних тканинах на певних етапах розвитку чи в умовах зовнішнього середовища [48].

Типова експресійна касета складається з кодуючих послідовностей одного або декількох генів, регульованих промоторами з певними моделями експресії — конститутивними, індукцибельними або тканинно-специфічними — та транскрипційним термінатором. Прогнозувати вплив кодуючих послідовностей на рівень експресії трансгенів заздалегідь складно, тому це визначають експериментально. Важливим є підбір відповідних регуляторних компонентів для досягнення бажаних рівнів експресії, і він є не менш важливим, ніж вибір самих кодуючих послідовностей.

На сьогодні геномні і транскриптомні дані допомагають у визначенні промоторних ділянок для трансгенів. Проте, активність цих промоторів залежить від довжини та точного місця інтеграції трансгену, що може знижувати рівень експресії (Hernandez-Garcia і Finer, 2014). Більшість промоторів демонструють активність лише в рідних рослинах, тому їхне

застосування для інших видів потребує додаткових досліджень. Обмежений набір тканинно-специфічних та умовно-чутливих промоторів для сільськогосподарських культур створює перешкоди для швидкого розвитку генетичної інженерії [48], особливо при проектуванні складних метаболічних шляхів.

Для подолання цих обмежень важливе значення мають синтетичні промотори з визначеними функціональними модулями. Такі промотори, які забезпечують певну силу та специфічність експресії (конститутивність, часова чи тканинна індукцибельність), є перспективними в трансформаційних стратегіях [49-51].

Сучасні методи складання великих фрагментів ДНК з множинними трансгенами, такі як GoldenBraid2.0 та Golden Gate MoClo, значно спрощують та прискорюють процес конструювання експресійних касет. Ці методи, засновані на використанні рестрикційних ферментів типу II, таких як *VspI*, *BsaI* і *Esp3I*, дозволяють створювати багатогенні касети за мінімальну кількість клонувальних кроків. Наприклад, за допомогою MoClo можна зібрати одинадцять експресійних модулів всього за три клонувальні етапи [52]. У GoldenBraid2.0 використовується подібний підхід із ферментами *VspI* та *BsmBI*. Важливо, щоб всі модулі не містили послідовностей для рестрикції, що дозволяє уникати помилок на етапі складання.

Зазначені методи пропонують широкий вибір векторів, що сумісні з трансформацією *Agrobacterium tumefaciens*, а також надають захист від антибіотиків для зручного комбінування всіх елементів ДНК. Ці методи є надійними і дозволяють обходитися без ПЛР та гелевого очищення, що робить процес ефективним та малоймовірним до помилок.

1.7 Методи перенесення векторів в рослинний геном

Трансгенні підходи активно застосовуються для вивчення функцій генів у модельних рослинних організмів, таких як арабідопсис, тютюн і рис, а також

використовуються для розробки нових або покращення існуючих ознак у багатьох культурах [53]. Для успішної трансформації необхідно вибрати відповідні тканини-мішені та забезпечити асептичні умови для введення ДНК, а також розробити методи селекції та регенерації трансгенних рослин. Якість отриманих соматичних ембріонів залежить від типу експлантів (наприклад, молодих листків, меристем, гіпокотилів) і від належної їх обробки [54-55].

Соматичні ембріони, які формуються із вегетативних клітин, проходять стадії розвитку, подібні до зиготних ембріонів, і включають глобулярну, серцеву, торпедо та сім'ядольну фази [55]. Одним із ефективних методів є отримання рихлого ембріогенного калусу (FEC), який складається з ембріональних клітин і є більш придатним для трансформації завдяки зниженому ризику формування химерних рослин [56]. У деяких випадках трансформують гаметофітні клітини або культури мікроспор для отримання гомозиготних рослин шляхом подвоєння геному.

Прямі та непрямі методи доставки трансгенів включають бомбардування частинками та агробактеріальну трансформацію [57]. Агробактеріальна трансформація, як правило, забезпечує більш стабільну експресію трансгенів із меншою кількістю копій, тоді як бомбардування частинками часто призводить до введення більшої кількості копій ДНК [58]. Обидва методи можуть застосовуватися разом для подолання обмежень *in vitro*-регенерації у важкодатних до регенерації рослин [59].

Нещодавні досягнення включають впровадження CRISPR/Cas для редагування геному, що дозволяє швидко покращувати ознаки сільськогосподарських культур, зокрема врожайність, стійкість до стресів та якість продукції (). CRISPR/Cas забезпечує високу точність редагування і може бути інтегрована в геном за допомогою агробактерій або доставлена транзитивно за допомогою нуклеопротеїнів. Доставка компонентів CRISPR/Cas здійснюється методами ПЕГ-опосередкованого переносу,

електропорації та ліпофекції [59], що відкриває нові можливості для створення рослин без генетичних модифікацій [60].

Ці методи постійно адаптуються та вдосконалюються для різних сільськогосподарських культур, зокрема таких, як маниок і рис, що мають особливе значення для малих фермерів [61]. На основі цих досягнень формується потужна основа для прискореного розвитку біотехнологій у рослинництві [62].

1.8 Селекція трансгенних рослин

Маркерні гени відіграють важливу роль у селекції трансгенних рослин, оскільки вони дозволяють ідентифікувати клітини, тканини або пагони, що містять бажані ДНК-конструкти на етапі регенерації. Залежно від їхньої функції, маркерні гени поділяються на позитивні та негативні. Негативні маркери зазвичай кодують ферменти, що надають стійкість до антибіотиків (наприклад, канаміцину, гігроміцину) або гербіцидів (фосфінотрицину, гліфосату) [63]. Позитивні ж маркери забезпечують трансформованим клітинам здатність метаболізувати специфічні субстрати (фосфоманозу, цукровий спирт, аналоги амінокислот), які не засвоюються звичайними рослинними клітинами [64].

Також використовуються гени, що кодують білки з візуальними сигналами, наприклад, флуоресцентні або пігментовані білки, для відстеження трансформації. Це так звані репортерні гени, такі як зелений флуоресцентний білок (GFP), білок DsRed, або білки, що продукують антоціанові пігменти [65]. Такі гени полегшують візуальний контроль за процесом селекції, але не беруть участі в остаточному етапі відбору трансформованих рослин.

У деяких країнах наявність маркерних генів у генетично модифікованих культурах викликає занепокоєння, особливо якщо йдеться про стійкість до антибіотиків, які використовуються в медицині. Це призводить до пошуку альтернативних методів трансформації рослин, які виключають використання маркерних генів або передбачають їх видалення. Такі підходи можуть

включати ПЛР для скринінгу, ко-трансформацію з подальшим генетичним розділенням маркерного гена і гена, що цікавить, або видалення маркера з трансформантів після трансформації [66].

Трансгенні рослини без маркерів допомагають знизити ризики генетичного переносу від ГМ-культур до дикорослих видів або не-ГМ культур, а також можуть зменшити метаболічне навантаження на рослину, сприяючи громадському прийняттю таких культур [67].

Серед ефективних методів видалення маркерних генів можна назвати використання системи рекомбінації Cre/lox, де рекомбіназа Cre видаляє маркерний ген, розпізнаючи специфічні сайти lox, або системи транспозонів Ac-Ds, де транспозаза розриває послідовність, що містить маркер, залежно від потреб трансформації [68]. Ще один метод — ко-трансформація з флуоресцентними маркерами, як GFP, або ферментами, такими як β -глюкуронідаза (GUS), які дозволяють легко ідентифікувати трансформовані клітини без використання антибіотиків [69].

Ці підходи спрямовані на підвищення ефективності трансформації рослин і зниження потенційних ризиків, пов'язаних із ГМ-технологіями, що є актуальним у світлі зростаючої уваги до безпечності біотехнологічних культур.

1.9 Експресія трансгенів в залежності від розташування в геному

Стабільна та надійна експресія трансгенів є ключовою умовою для успішного розвитку генетично модифікованих (ГМ) культур. Багатофакторність цього процесу означає, що на експресію трансгену впливають численні чинники. Часто змінність у роботі трансгенів викликана транскрипційною або посттранскрипційною інактивацією [70], рівнем плоідності геному рослини, що експресує трансген [71], а також місцем хромосомної інтеграції ДНК-конструкту [72]. Інтеграція кількох копій трансгену також може сприяти його інактивації через механізми генетичного глушіння [73]. Змінна експресія трансгену в рослинах з однаковим генетичним фоном, які були створені за однакових умов, є поширеним явищем.

Для мінімізації цієї варіабельності зазвичай створюється велика кількість незалежних трансгенних ліній з подальшим відбором найбільш стабільних і порівнянних варіантів експресії білка, уникненням множинних вставок, що є стандартною практикою для комерційного вирощування ГМ-культур [75]. Однак у процесах, таких як біолістичне введення ДНК-конструктів чи використання *Agrobacterium*, часто неможливо точно контролювати місце інтеграції Т-ДНК або кількість інтеграційних подій. У деяких випадках випадкове вбудовування трансгену може порушити роботу ендогенних генів, оскільки Т-ДНК часто інтегрується в генні або активні регіони хроматину [76]. Такі випадки є небажаними для регуляторного затвердження ГМ-культур, що робить процес оцінки комерційних трансгенних подій трудомістким і вартісним, зазвичай вимагаючи багаторічних польових досліджень для оцінки ризиків [77].

Розроблено кілька стратегій для зниження варіабельності між незалежними трансгенними лініями та скорочення витрат на комерціалізацію ГМ-культур. Використання заздалегідь перевірених промоторів з оптимізованими регуляторними послідовностями та відповідними термінаторами дозволяє стабілізувати експресію трансгенів. Крім того, ДНК-касети для експресії можуть містити регіони прикріплення до матриксу (MARs), які сприяють стабільній експресії генів і знижують ризик інактивації трансгену. MARs або «ізолятори» допомагають забезпечити автономність генів і запобігти взаємному впливу промоторів у багатогенних касетах, а також зменшують вплив позиційного ефекту на трансгени в геномі рослини (Zhao та ін., 2019). Усі ці заходи в комплексі сприяють стабільній і тканинно-специфічній експресії трансгенів [78].

Для досягнення ідеального результату, трансген бажано вбудовувати у заздалегідь визначену цільову ділянку ДНК (майданчик інтеграції), яка вже відома стабільною експресією генів, інтеграцією певної кількості копій, та не впливає на продуктивність рослини [79]. У клітинних культурах тварин уже

використовуються методи, які дозволяють впроваджувати ДНК у конкретні ділянки геному за допомогою рекомбіназного введення гетерологічної ДНК [80]. У рослинах використання нуклеаз із цинковими пальцями, які здійснюють цілеспрямовані розриви ДНК для інтеграції трансгенів, було вперше описано в 2009 році [81]. Останні досягнення в галузі генетичних інструментів, таких як CRISPR-Cas9, обіцяють швидкий прогрес у спрямованій інтеграції трансгенів у визначені майданчики в геномі рослин, що дозволяє досягти стабільної експресії і створення мультигенних касет [82]. Ці стратегії можуть стати в нагоді для редагування або заміни наявних трансгенів, а також для модифікації ендегенних генів, що сприятиме прискоренню розвитку нових корисних ознак або покращенню характеристик сільськогосподарських культур.

1.10 Нормативні процедури для тестування та затвердження ГМ-культур

Перед комерційним впровадженням будь-якого нового сорту сільськогосподарської культури, як генетично модифікованого (ГМ), так і не-ГМ, він та його звичайний аналог повинні пройти комплексні польові випробування у різних місцевостях для оцінки агрономічної продуктивності. Переважна частина занепокоєнь, пов'язаних із польовими випробуваннями ГМ-культур, особливо в Європі, стосується захисту здоров'я людей та тварин, а також впливу на навколишнє середовище через можливі ризики, пов'язані з ГМ-ознаками [83]. Серед таких ризиків — непередбачуваний генний потік від ГМ-культур до традиційних сортів [84], розвиток стійкості шкідників або алергенність білків, що синтезуються ГМ-рослинами. Ці фактори потребують ретельного вивчення та врегулювання до дозволу на випуск ГМ-культур для польових випробувань або комерційного використання [85].

Процес розгляду і схвалення заявок на проведення польових випробувань ГМ-культур залишається складним і зарегульованим, хоча у деяких країнах існують детально прописані вимоги для таких випробувань [86]. Час, необхідний для отримання дозволу на польові випробування ГМ-

культур, також варіюється залежно від країни. Процедура затвердження нового сорту ГМ-культури є трудомісткою, затратною і тривалою, залучаючи численні державні та недержавні організації (НГО). Це може стримувати розвиток і комерціалізацію ГМ-культур у державних науково-дослідних установах, які часто не мають необхідних фінансових ресурсів для виходу на ринок [86].

Запровадження єдиних і послідовних правил для польових випробувань і затвердження нових сортів ГМ-культур, прийнятих на міжнародному рівні, значно прискорило б процес і сприяло глобальному прогресу в дослідженнях і розробці ГМ-культур.

1.11 Коліцини – огляд та характеристика

Коліцини — це білки, які синтезуються деякими штамами кишкової палички та є токсичними для них самих. Їх виробляють штами кишкової палички, що мають коліциногенну плазмиду з генетичними детермінантами, які забезпечують синтез, імунітет і вивільнення коліцинів. В статті розглядаються ключові аспекти біології коліцинів: їхній синтез, який регулюється системою SOS; вивільнення в позаклітинний простір, що відбувається за допомогою лізисного білка коліцину; механізми поглинання та дії. Коліцини складаються з трьох доменів, кожен з яких бере участь у різних етапах руйнування чутливих бактерій. Структура деяких коліцинів досліджена на атомному рівні. Їхня летальна дія починається із зв'язування з рецепторами зовнішньої мембрани, які також використовуються для транспорту поживних речовин. Після цього коліцини проникають через зовнішню мембрану і периплазму з допомогою систем Tol або TonB, компоненти яких відомі і описані. Далі коліцини досягають своєї цільової мішені та діють шляхом створення потенціалзалежного каналу у внутрішній мембрані або проявляючи ендонуклеазну активність, що впливає на ДНК, рРНК або тРНК. Описані механізми інгібування специфічними білками імунітету. Нарешті, розглядаються можливості використання коліцинів як лабораторних та біотехнологічних інструментів, а також їх еволюція [87].

Коліцини — це білки, які виробляються деякими штамми кишкової палички (*E. coli*) та є летальними для близькоспоріднених штамів. Перший коліцин був ідентифікований Грація у 1925 році як термолабільний продукт, наявний у культурах *E. coli* V, який проявляв токсичність щодо *E. coli* φ (235). Пізніше було досліджено низку коліцинів, синтезованих різними штамми бактерій кишкової групи, зокрема *E. coli*, *Shigella* та *Citrobacter*. Назву «коліцин» запропонували Грація і Фредерік у 1946 році, які довели білкову природу коліцинів і їхню специфічність щодо спектру дії (236). Згодом ввели термін «бактеріоцин» для позначення токсичних білків, що виробляються певними бактеріями і діють проти споріднених видів, але не шкодять виробнику [88].

За аналогією з коліцинами, нові родини бактеріоцинів отримують назву бактерій-продуцентів з додаванням суфікса "-цин", наприклад, піоцини від *Pseudomonas pyogenes*, клоацини від *Enterobacter cloacae*, марцецини від *Serratia marcescens*, мегацини від *Bacillus megaterium* тощо. Фредерік запропонував номенклатуру, що використовує назву роду замість виду для унікальності, наприклад, пастерелацини та ієрсиніацини замість «пестицинів». Однак ця порада не була прийнята, можливо, щоб зберегти традиційну назву «коліцин» замість «ешерихіацин». Сьогодні термін «бактеріоцин» здебільшого застосовується до антибіотичних пептидів, які синтезуються грампозитивними бактеріями та мають широкий спектр дії. Ці пептиди, як і білкові бактеріоцини, мають специфічний імунний механізм, що захищає продуцентів від їхньої токсичності [89].

Незважаючи на певну плутанину в номенклатурі, що супроводжує дослідження коліцинів із самого початку, варто зазначити, що перший ідентифікований коліцин V нині класифікується як мікроцин, хоча зберігає назву «коліцин». Мікроцини представляють собою низькомолекулярні антибіотики, які продукуються ентеробактеріями і діють на філогенетично споріднені штами [90].

Фредерік встановив, що вузький спектр дії коліцинів зумовлений наявністю специфічних рецепторів на поверхні чутливих штамів, з якими вони зв'язуються. Мутація рецептора може зумовити втрату чутливості до відповідного коліцину. Стійкі до кожного коліцину мутанти були виділені й названі за абетковими літерами, відповідно до рецепторів, з якими зв'язуються коліцини. Якщо кілька коліцинів зв'язуються з одним рецептором, вони отримують додаткові числові індекси, як наприклад дев'ять коліцинів E: E1 – E9. Встановлено, що ці рецептори є білками зовнішньої мембрани, які беруть участь у транспортуванні поживних речовин, таких як нуклеозиди, сидерофори та вітаміни. Рецептор VtuB, що переносить вітамін B12, а також дев'ять коліцинів E та фаг BF23, був першим рецептором коліцинів, очищеним Сабетом і Шнайтманом у 1973 році [91].

Серйозний інтерес до вивчення коліцинів виник після дослідження Якоба та ін. у 1952 році (297). Вивчаючи коліцин E1, вони показали, що (i) синтез коліцину в клітинах *E. coli* індукується агентами SOS, подібно до лізогенних фагів, і є летальним для продуцентів; (ii) після синтезу коліцин вивільняється в середовище (згодом з'ясувалося, що це не завжди так); (iii) коліцин знищує чутливі клітини з кінетикою одноразового влучення; (iv) бактерії-продуценти захищені від коліцину завдяки білку імунітету. Дослідники порівняли коліцини з бактеріофагами, з якими вони мають спільні властивості: специфічність дії, зв'язування з рецепторами, схожу кінетику, імунітет, а також летальність після обробки мутагенами [92]. Ця робота стимулювала численні дослідження щодо механізму дії коліцинів.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Вибір та загальний опис об'єкту дослідження

Об'єктом для експериментів було обрано насіння японської капусти Мізуна *Brassica rapa* var. *niposinica* сорту «Високоврожайний», а також насіння салату посівного *Lactuca sativa* сорту «Одеський кучерявий». Весь біологічний матеріал був люб'язно виданий ІКБтаГІ НАН України.

2.2 Хімічні речовини та обладнання

Для стерилізації насіння *L. Sativa* були використані наступні реактиви:

- розчин етанолу 70%
- розчин білизни 40%
- стерилізована та дистильована вода

Для отримання культури в середовищі Luria bertani *A. tumefaciens* були застосували такі реактиви як:

- триптон (10 г/л)
- екстракт дріжджів (5 г/л)
- натрій хлорид (10г/л)

Для культивування *E. coli* в середовищі LB Tel10 застосували ті ж самі реактивів, але з додаванням тетрацикліну (0,01 г/л).

Щоб отримати середовище для пророщування насіння, а також трансформації використовували наступні реактиви:

- сахароза (30 г/л)
- гліцин (2 г/л)
- β-індолілоцтова кислота (0,002 г/л)
- кінетин (0,0025 г/л)
- агар (10 г/л)
- міо-інозитол (0,1 г/л)
- тіамін гідрохлорид моногідрат (0,0005 г/л)

- нітрат амонію (1,60 г/л)
- нітрит калію (1,8 г/л)
- хлорид кальцію гептагідрат (0,44 г/л)
- трилон ЕДТА (7,45 г/л)
- йодид калію (0,0008 г/л)
- молібдат натрію дигідрат (0,00024 г/л)
- сульфат купруму (2,5e-4 г/л)

З метою отримання регенерантів рослин в середовищі B5R використовували наступні реагенти:

- сахароза (20 г/л)
- фосфінотрицин (0,005 г/л)
- кінетин (0,003 мг/л)
- 2,4 дихлорфеноксіоцтова кислота (0,002 г/л)
- дигідрогенфосфат натрію (0,15 г/л)
- цефтріаксон (0,55 г/л)
- нафтилоцтова кислота (4e-4 г/л)
- калій нітрат (3 г/л)
- амоній сульфат (0,134 г/л)
- магній сульфат (0,5 г/л)
- хлорид кальцію (0,15 г/л)
- моногідрат сульфат марганцю (0,01 г/л)
- ортоборна кислота (0,003 г/л)
- сірчаноокислий цинк тетрагідрат (0,002 г/л)
- йодид калію (0,00075 г/л)
- сульфат купруму (4у г/л)
- кобальт хлорид (3e г/л)

Для виділення ДНК застосовували наступні реагенти:

- ЦТАБ-буфер

- Деіонізовану воду

Гормони: кінетин, НОК, індолілоцтова кислота

Для очистки ДНК використовували буферний розчин ЦТАБ (цетилтриметиламоній бромід) з наступним складом:

- Меркаптоетанол рН 8
- 1,4 мМ NaCl
- 20 мМ EDTA
- 100 мМ Трис-HCl
- 2% ЦТАБ

Для проведення електрофорезу використовували буфер TAE наступного складу:

- 2М трис
- 1М оцтова кислота
- 50 мМ EDTA

Електрофорез проводився в 1 % агарі на основі вищеописаного TAE буфера.

З метою проведення полімеразно ланцюгової реакції застосовували буфер DreamTaq 10X, виробництва ThermoFisher, США наступного складу:

- 750 мМ трис-хлоридна кислота
- 200 мМ сульфата амонія
- 20 мМ хлориду магнія

Для експериментів використали наступне обладнання:

- ламінар бокс Assab Box 161
- електроплита Термія
- водяна баня 1500W HH-S6 Zenith Lab
- аналітичні ваги KERN ABJ 80-4NM
- центрифуга EBA 200
- термоциклер Mastercycler Eppendorf 23F

- транслюмінатор Gel Doc XR
- апарат для електрофорезу BIO-RAID Mini-Protean Tetra Cell
- спектрофотометр Nanodrop 1100
- Сухожарова шафа Міазма ГП 40

2.3 Опис векторної системи для трансформації

З метою отримання трансгенних рослин з конститутивною продукцією коліцину М була застосована експресійна касета рСВ052 [88] яка складалась з наступних елементів (рис):

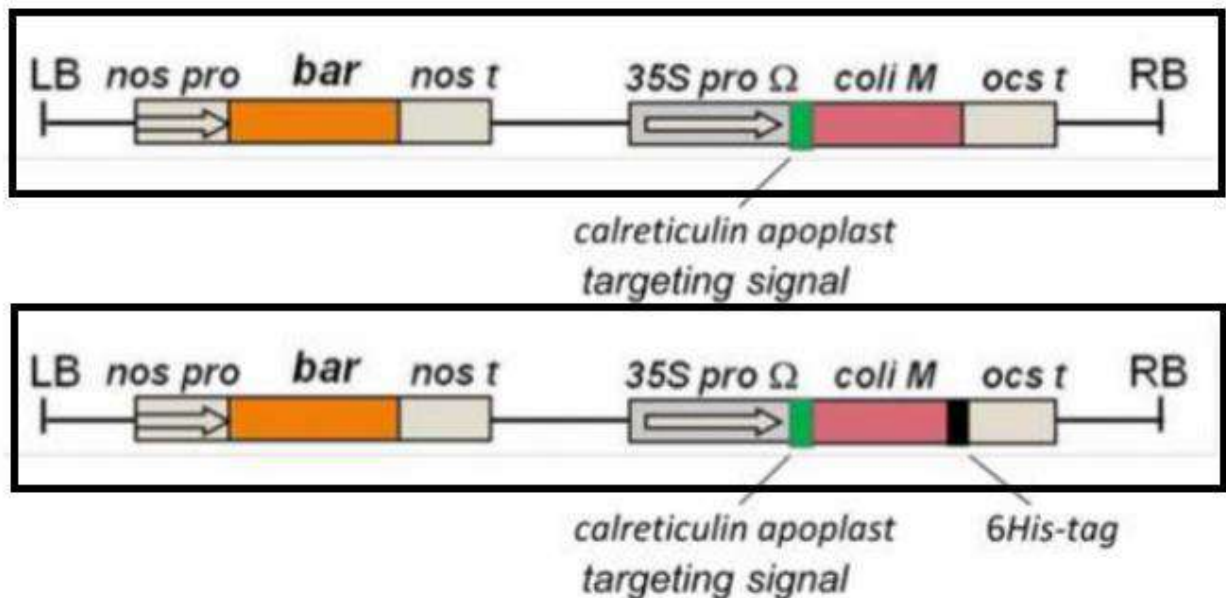


Рис. 2.1. Ілюстративна схема Т-ДНК вектору рСВ052

- *bar* ген, котрий несе РРТ-трансферазу, котра надає резистентність до глюфосинату амонію (гербицид)
- NOS промоторна ділянка
- промотор 35S (від вірусу мозаїки цвітної капусти)
- ген коліцину М
- NOS термінуюча ділянка

2.4 Характеристика штаму *Agrobacterium tumifaciens*

Для виконання магістерської роботи була використана бактеріальна культура *Agrobacterium tumifaciens* AGL1, це один з найпопулярніших штамів для генетичної трансформації з широким спектром рослин та високою ефективністю перенесення Т-ДНК. Після зняття культури з депонації при температурі -80°C в спеціальному середовищі з ДМСО та гліцерином, було проведено її розморожування та пересів на середовище LB (підрозділ 2.2) з культивуванням протягом 24 годин при температурі 28°C (рис 2.2).

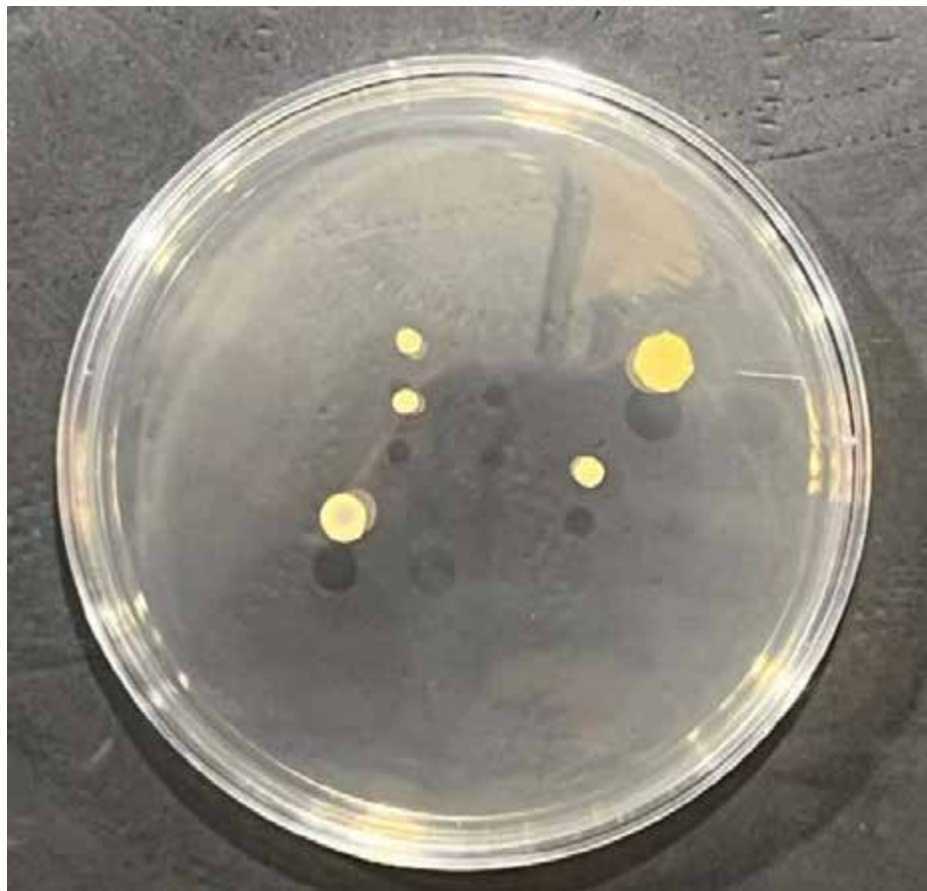


Рис. 2.2 Колонії агробактерії AGL1

Наступним кроком, знову переносили на свіже середовище LB, витримували ще 24 години з тією ж температурою і додаванням вектору. Далі колонії переносили на середовище LB з рифампіцином на 36 годин. Після чого трансформовані колонії відбирались візуально для подальшого отримання нічної культури для співкультивування з експлантами (Рис. 2.3)

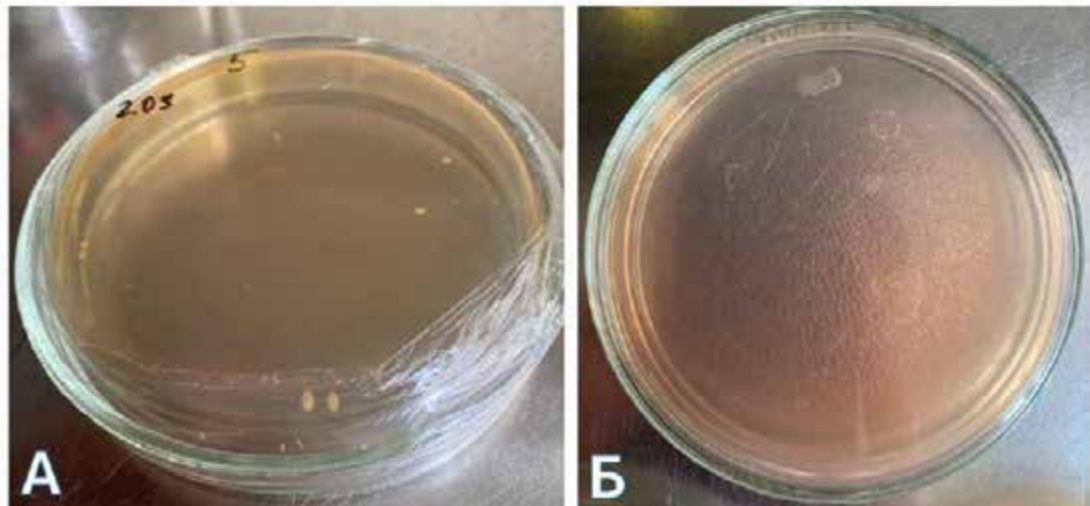


Рис. 2.3. А – колонії агробактерій, які інтегрували вектор, Б – ЧП на якій не утворились колонії з вектором

Для отримання нічної культури переносили за допомогою мікробіологічної петлі на свіже середовище LB з антибіотиками, а саме з RIF (40 мг/л) і gent (20 мг/л) і витримували ще 14 годин з тією ж температурою і додаванням вектору за методикою нічної культури для оптичної густини 0,6, після чого проводили центрифугування й ресуспендування з метою отримання кінцевої оптичної густини 0,3 [90]. Далі колонії відбирались візуально для подальшого співкультивування з експлантами.

2.4.1 Характеристика штаму *Escherichia coli* DH5a

Для перевірки бактеріостатичної дії був обраний штам DH5a, через свою безпечність для досліджень, оскільки може використовуватись за стандартами BSL-1, та схожий метаболізм з патогенними штамми, наприклад K-12 [93].

Після зняття з депонації при -80°C , ампулу з замороженою культурою було швидко перенесено на водяну баню з температурою 37°C до повного розмороження. За допомогою стерильної мікробіологічної петлі була відібрана невелика кількість відталої культури та перенесено на свіже середовище LB, культивували 16 годин при температурі 37°C (рис. 2.4).



Рис. 2.4 Колонії *E. coli* DH5a

Клітини бактерії кишкової палички штаму DH5a культивували за методом нічної культури на рідкому середовищі LB Tel10 (підрозділ 2.2) на орбітальному шейкері при 190 об/хв протягом 16 годин і температурі 37°C (рис. 2.5).

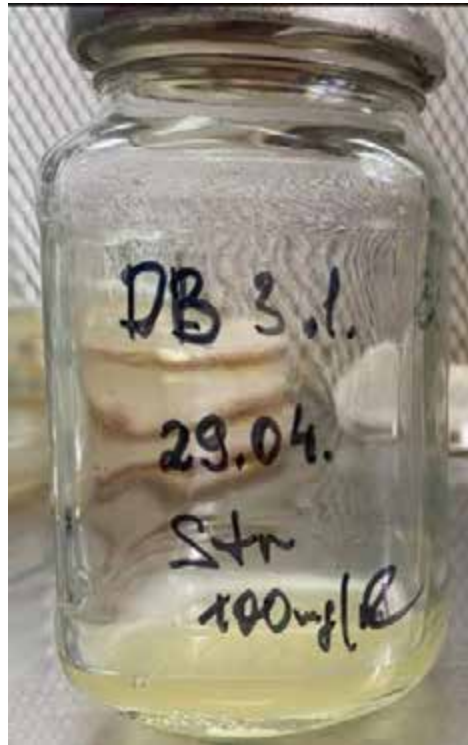


Рис. 2.5 Нічна культура *E. coli* DH5a

2.3 Особливості введення *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica* в культуру *in vitro*

Для введення в культуру *in vitro* *L. sativa* насіння занурювали в розчин етанолу на 60 секунд, після чого слідувала обробка розчином білизни в концентрації 40-60 % протягом 10 хвилин для насіння або в сухожарову шафу на годину при 160-180 °C .

Насіння *B. Rapa* поміщали в розчин 40% білизни на 8 хвилин для насіння *B. Rapa*. По закінченню часу насіння промивали три рази стерильним дистиллятом [94].

Наступним кроком було перенесення стерильного насіння в чашки Петрі з середовищем Мурасіге і Скуга з подальшим культивуванням при температурі 25° C і 16-годинним фотоперіодом (Рис. 2.6).



Рис. 2.6 Стерилізоване насіння на середовищі МС

Обидві рослини проростають за 3-7 діб, проте наступні етапи дослідження проводились через 1-2 тижні, щоб рослини були більш сформовані.

2.4 Виділення ДНК з рослинного матеріалу

Для виділення тотальної ДНК з рослинного матеріалу використовували метод СТАВ [93].

З цієї метою відбирали від 200 до 500 мг свіжого листя рослин з отриманих ліній рослин. Даний рослинний матеріал механічно гомогенізували за допомогою ступок та додавали пропорційний об'єм 2 М NaCl, після чого витримували при 56 °С одну годину. Наступним кроком додавали одну десяту об'єму розчину 10% цетриміду з 1М фізрозчином. Гомогенат переносили в епіндорфи та витримували на вортексі 10-20 секунд. Наступним етапом була

інкубація гомогенату протягом 10 хвилин при температурі 65°C на водяній бані. Далі з метою депротейнізації до суміші додавали в пропорції 1:1 розчин хлороформу-ізоамілового спирту (24 до 1). Після чого переносили на центрифугу на 6 хв на 14000 RPM (рис 2.7).



Рис. 2.7 Гомогенізований рослинний матеріал з ЦТАБ

По закінченню центрифугування водну фазу з нуклеїновою кислотою виділяли і додавали до неї рівний об'єм ЦТАБ-буферу (підрозділ 2.2).

Отриману суміш витримували 35 хвилин при 20°C, після чого знову центрифугували 20 хвилин при 5000 RPM. Водну фазу знову вилучили, а до пробірки внесли 350 мкл 1М NaCl. Як тільки залишки повністю розчинялись, до суміші додавали 700 мкл етилового спирту. Отримані зразки використали для молекулярно-генетичних досліджень за допомогою ПЛР.

2.5 ПЛР аналіз виділеної ДНК

Метод ПЛР було застосовано з метою перевірки чи інтегрувався цільовий ген в отриманих рослинах. В першу чергу була отримана реакційна суміш, компоненти якої наведені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Компоненти для ПЛР з розрахунку на одну пробу

Складові суміші	V в мкл
Forward праймер	1
Reverse праймер	1
dNTP	2
Taq-полімераза	1
Буфер	2
ДНК	1
Деіонізована вода	12

Для проведення ПЛР дослідження було взято по 5 зразків ДНК кожної рослини та контролі, для позитивного контролю взято вектор pCB052, для негативного контролю нетрансформовану рослину і ще одна проба з деіонізованою водою для перевірки правильності роботи ампліфікатора [94].

ПЛР здійснювався за допомогою ампліфікатора Mastercycler Eppendorf 23F за наступних умов, наведені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Налаштування ампліфікатора для ПЛР

Стадія	T (°C)	Час	Повтори
Стартова денатурація	94	3 хв	1
Денатурація	94	30 с	25
Віджиг	62	30 с	25

Елонгація	72	30 с	25
Заклучна елонгація	72	5 хв	25
Термінація	20	3 хв	1

Для підтвердження успішного трансгенезу мали отримати амплікон розміром в 231 пар нуклеотидів. З цією метою були використані праймери наступного нуклеотидного складу (табл 2.3).

Таблиця 2.3

Праймери для ПЛР

Назва	Нуклеотидний склад	Т віджигу	Розмір амплікона
Var201_F	5'-ААТЦТЦГГТГАЦГГГЦАГГА-3	64 °С	231 п.н
Var201_R	5'-ТАЦАЦЦАЦЦТГААГТ-3	58 °С	

2.6 Аналіз ампліконів за допомогою гель-електрофорезу

З метою електрофоретичного розділення отриманих ампліконів був використаний апарат BIO-RAID Mini-Protean Tetra Cell. Експеримент проходив в 1% спеціальному агарозному гелі для молекулярних досліджень. Гель робили на ТАЕ буфері (підрозд. 2.2) та додавали 5 мкл етидій броміду в якості інтеркалюючого агента [95].

У випадку постановки експерименту з салатом посівним наносили 20 мкл зразку в кожному лунку в наступному порядку:

1. Маркер з олігонуклеотидами різної довжини
2. Позитивний контроль – експресійна касета
3. Негативний контроль – ДНК звичайного салату посівного
4. Зразок трансформованого салату
5. Негативний контроль – деіонізована вода

6. Чотири зразки трансформованого салату

У випадку постановки експерименту з трансформованими рослинами мізуни зразки наносились в наступному порядку:

1. Маркер з олігонуклеотидами різної довжини
2. П'ять зразків трансформованої мізуни
3. Позитивний контроль
4. Негативний контроль з нетрансформованою рослиною
5. Негативний контроль – деіонізована вода

2.7 Отримання витяжки з трансформованих рослин

Для проведення подальших експериментів по визначенню бактеріостатичної дії була поставлена мета отримати витяжку з трансгенних рослин. Для отримання витяжки з трансформованих рослин відбиралось 600 мг біомаси молодих листків (рис. 2).



Рис. 2.8 Відібраний рослинний матеріал для екстрагування

Після ретельної гомогенізації в ступках на льоді, було додано рівний до біомаси об'єм 1М трис-НСІ. Отриману суміш переносили в центрифужні

пробірки та проводили центрифугування з охолодження 12 хв та 14 000 RPM. Водяна фаза відбиралась за допомогою мікропіпеток та переносилась в стерильні епіндорфи. Приготований екстракт одразу використовувався для спот тесту [96].

2.8 Перевірка біологічної активності екстрактів

Для перевірки бактеріостатичної дії використовувався метод Кірбі-Бауера [97]. Для цього свіжий рослинний матеріал обрізали та переносили на ЧП з середовщем LB з кишковою паличкою штаму DH5a (підрозділ 2.5) та інкубували протягом 24 год при 37°C. Після чого візуально оцінювали зони інгібування бактеріального росту.

Також проводили спот тест для перевірки антибактеріальної дії екстрактів [98]. З цією метою отримані екстракти наносили при тих самих умовах, що і при методі Кірбі-Бауера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica* в культурі *in vitro*

Оптимізована схема введення в культуру *in vitro* продемонстрували найвищу ефективність при використанні 40% білизни в якості стерилізуючого агента, який елімінує мікробну та грибкову контамінацію з найменшою токсичною дією. Розчин 40% білизни ефективно стерилізував насіння, при цьому зберігаючи вітальність насіння в 86%, проросло 43 з 50 насінини. Після обробки розчином 50% білизни спостерігалась певна токсичність, а після 30% розчину білизни виявили розвиток актиноміцетів в деяких чашках Петрі.

Крім того, була перевірена ефективність термічної стерилізації при 160-180°C протягом години. Отримані результати показали, що термічна обробка має нижчу ефективність, ніж хімічна стерилізація (рис 3.1).



Рис 3.1 Співвідношення пророслих та інактивованих насінин *Brassica rapa* var. *niposinica*

Результати показали, що термічна обробка може мати як позитивний, так і негативний вплив на схожість насіння. Найбільш ефективною виявилась обробка при 170 °С з 48% пророслого насіння, детальна інформація наведена нижче (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Умови стерилізації на проростання насіння *Lactuca sativa*

Метод стерилізації	Кількість насіння, що проросло	Ефективність в %
Білизна 30%	32	64
Білизна 40%	43	86
Білизна 50%	40	80
Сухий жар 150 °С	18	36
160 °С	24	48
170 °С	8	16

Варто зазначити, що обробка сухим жаром екологічно чистий метод, бо не вимагає застосування хімічних речовини й не створює токсичних відходів, що робить цей метод безпечним для довкілля.

Насіння *Lactuca sativa* переносилось в стерильні чашки Петрі з середовищем МС та культивувалось при 25°С з 16-годинним фотоперіодом протягом 1-2 тижнів (рис. 3.2)

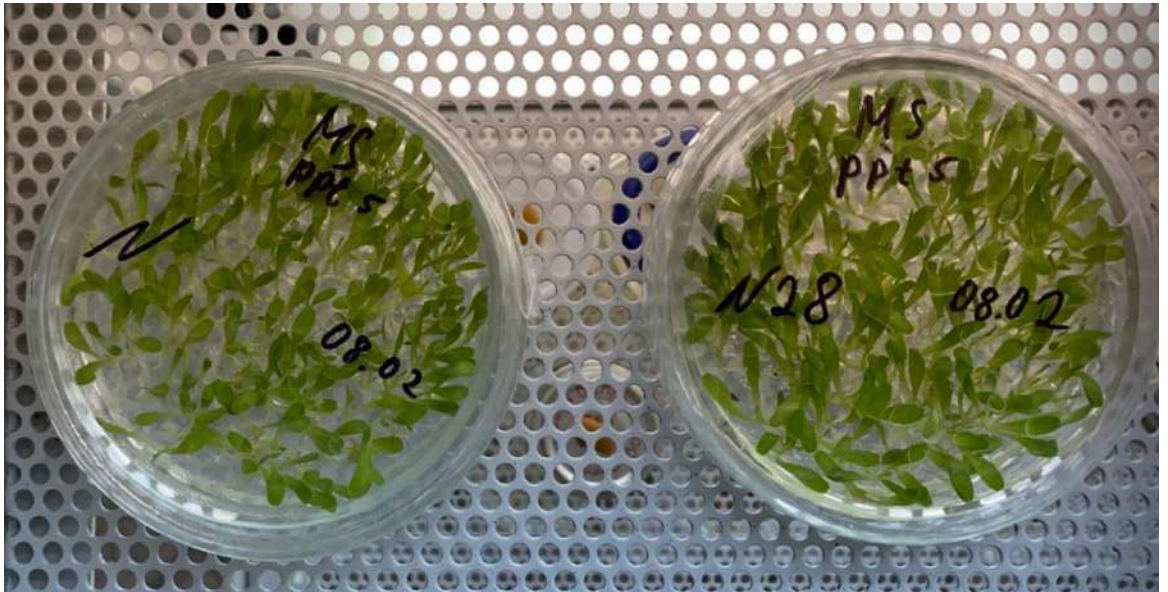


Рис. 3.2 *L. sativa* в культурі *in vitro*

Насіння *Brassica rapa* var. *niposinica* після стерилізації переносили в пінфлакони з середовищем та культивували при 25°C з 16-годинним фотоперіодом протягом 2 тижнів (рис 3.3)



Рис. 3.3 *Brassica rapa* var. *niposinica* в культурі *in vitro*

3.2 Трансгенез *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica*

З метою проведення генетичної трансформації *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica* були проведені експерименти за різними методиками виведення трансгенних рослин.

Трансгенез починали з отримання експланту, на якому лишали механічні пошкодження (Рис 3.4).



Рис. 3.4 Експлант для агробактеріальної трансформації

Отриману нічну культуру з агробактерією переносили для обробки в ЧП з експлантами (сім'ядолями) *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica*. *L. sativa* експозиціонували протягом 15 хвилин, а *B. rapa* var. *nip* протягом 20 хвилин.

Настпуним кроком експланти розміщували на фільтрувальному папері для видалення надлишку суспензії протягом 10-15 хвилин.

По завершенню часу і повного видалення залишків суспензії трансформовані експланти саджали в середовище B5R з додаванням глюфосинату амонію для відсіювання рослин без інтегрованого вектора на 5-10 днів. Дані методики базувались на різному часі внесення цефтріаксону,

котрий викликає інгібування векторних систем з Т-ДНК, вносили в проміжку між 24-72 годинами співкультивування. Також методики відрізнялись за часом додавання глюфосинату амонію, який виконує функцію пригнічення росту нетрансформованих рослин, тобто селективного агента.

Далі експланти переносили по 5 штук на ЧП на середовище Мурасіге Скуга з додаванням наступних реактивів (рис 3.5):

- 1 г/л 2-(N-морфоліно)етасульфонові кислоти (MES)
- 2,5 мг/л кінетину
- 0,5 мг/л нафтилоцтової кислоти

Витримували на даному середовищі від 24 до 72 годин та вносили цефтріаксон через 24, 48 та 72 години в еонцентрації 100-200 мг/л, глюфосинат амонію в концентрації 4-5 мг/л від 3 до 6 діб після інтеграції вектору.



Рис. 3.5. *Brassica rapa* var. *niposinica* на модифікованому МС

На даному середовищі рослини культивувались протягом 2 тижнів при 24° С і 16-годинним фотоперіодом.

Дані експерименту показують, що найкоротший час додавання цефтріаксону (24 години) та глюфосинату амонія (3 доба) не дає в результаті трансформованих рослин, практично всі експланти гинуть (рис. 3.6)



Рис. 3.6 Нетрансформовані рослини

При збільшенні часу культивування без додавання антибіотику до 72 годин, підвищувало частоту формування пагонів до 59%, при додаванні через 48 годин, частота склала 32%. Таким чином, було визначено, що оптимальний час внесення цефтріаксону складає 3 доби, а глюфосинату амонію через 5 діб, детально в таблиці

Таблиця 3.2

Вплив фосфінотрицину та цефтріаксона на регенерацію експлантів

Час внесення цефтріаксон (діб)	Час внесення фосфінотрицину (діб)	Частота регенерації в %
1	3	15
2	4	32
3	4	72
3	5	42
3	6	9

Була обрана краща схема з найвищою частотою регенерацією зелених пагонів, які потім ефективно проростали на МС з додаванням канаміцину. Дана схема відзначилась вищою кількістю експлантів з регенованими пагонами до сумарного числа перенесених рослин переведене у відсоткову вираженні.

Отримані рослини спочатку переносили в більші стерильні ємності для подальшого проростання на агаризованому середовищі МС з 0,5 мг/л індоліл масляною кислотою на 2 тижні при 24°С і 16-годинним фотоперіодом (рис 3.7).

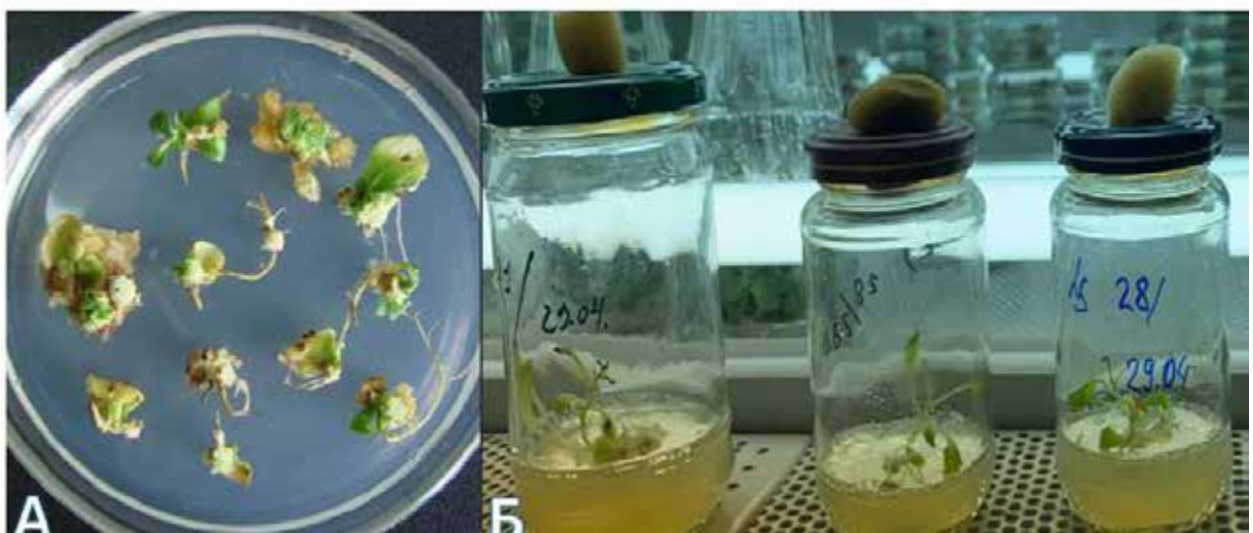


Рис. 3.7 Процес регенерації зелених пагонів (А) та вкорінення регенерантів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (Б)

Нетрансгенні рослини салату та мізуни висівали в касети з ґрунтом для подальших експериментів експериментів вирощувались з 16-годинним фотоперіодом при 25° С (рис. 3.8).



Рис. 3.8 Касети з рослинами-регенерантами

Потім пересаджувались у відкритий ґрунт і культивувались при тих самих умовах (рис 3.9).



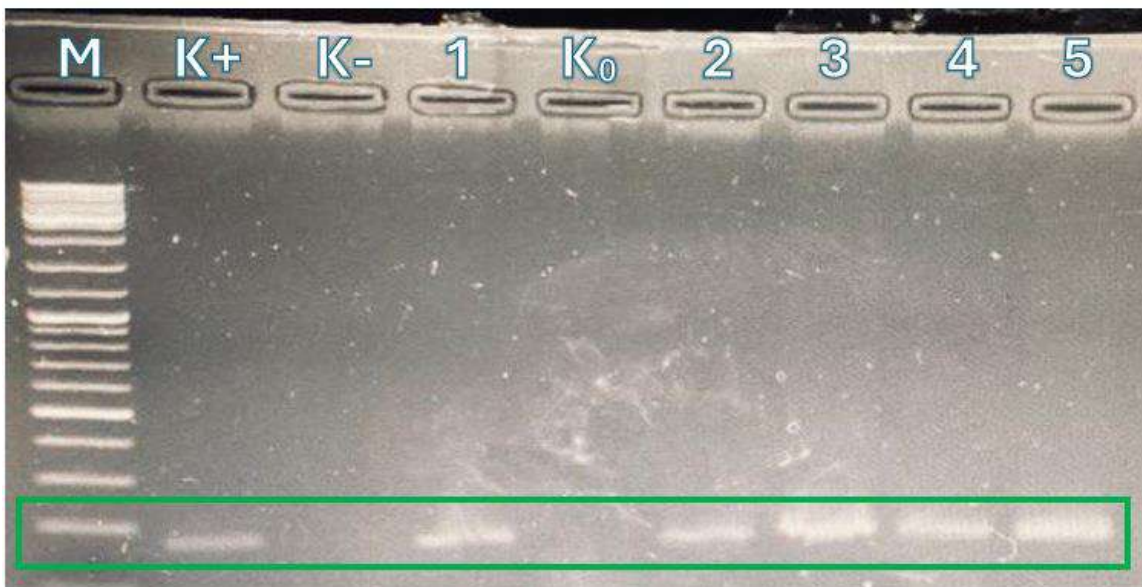
Рис. 3.9 *Lactuca sativa* на відкритому ґрунті

Отримані рослини були використані для подальших молекулярно-генетичних експериментів. З них також виділялись екстракти для оцінки біологічної активності.

3.3 Молекулярно-генетичне дослідження трансформованих рослин

Наступним кроком необхідно було перевірити наявність гену інтересу в трансформованих рослинах. З цією метою був використаний метод ПЛР для ідентифікації експресійної касети гену коліцину М з геном стійкості до гербіциду глюфосината амонію, а саме фосфінотріцину. Для цього тотальну рослинну ДНК, що була виділена за допомогою ЦТАБ-методу з сформованих регенерантів рослин, використали для ПЛР-реакції з праймерами до *bar* гену.

Після ПЛР (підрозділ II.8) зразки нанесли на 1% агарозний гель з бромистим етидієм для візуалізації результатів, фореуз проходив протягом 1 години при 100 вольтях. На рисунку 3.10 та 3.11 зображено результат ПЛР для трансгенних рослин *L. Sativa* та *Brassica rapa var niposinica*.

Рис 3.10 Електрофореграма зразків *Lactuca sativa*

В першій лунці маркер з олігонуклеотидами (М), за ним позитивний контроль (К⁺), в якості якого слугував вектор, далі тотальна ДНК звичайного салату (1), далі деіонізована вода, як негативний контроль (К₀) і чотири зразки трансформованого салату(2,3,4,5).

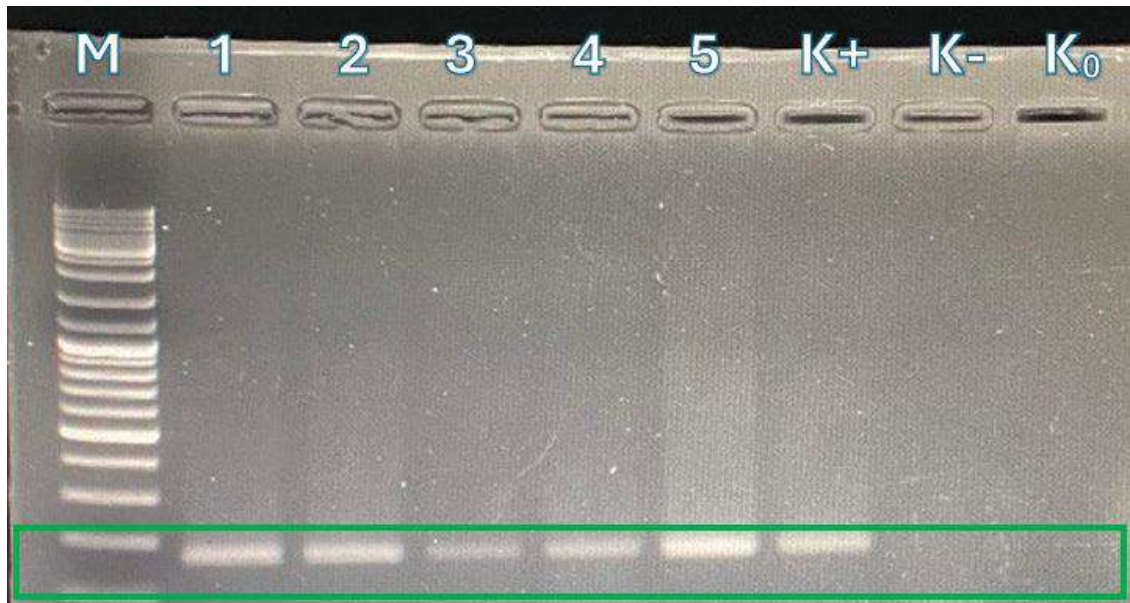


Рис. 3.11 Електрофореграма *Brassica rapa* var. *niposinica*

В першій лунці маркер з олігонуклеотидами (М), далі зразки трансгенної мізуни (1,2,3,4,5), за якими слідує аналогічний позитивний контроль (К⁺), негативний контроль (К⁻) та деіонізована вода (К₀).

На обох зразках можна побачити виразні лінії з шуканими зразками. В трансформованих зразках чітко видно шукані амплікони, що доводить успішну трансформацію рослин. Негативні контролі з нетрансгенними рослинами підтверджують відсутність експресійної касети в них. А контроль з деіонізованою водою підтверджує відсутність контамінації чужорідним генетичним матеріалом в зразках.

Результати дослідження підтверджують успішну інтеграцію Т-ДНК в геном трансформованих рослин. Наступний етап дослідження – бактеріостатичну дію рослинних екстрактів.

3.4 Бактеріостатична дія рослинних екстрактів

Для аналізу трансгенних рослин на бактеріостатичну дію використовувався модифікований диско-дифузний метод Кірбі-Бауера [65] та спот тест [66].

Для першого методу були відібрані листки трансгенних та нетрансгенних рослин та поміщені на агаризоване середовище LB з кишковою паличкою штаму DH5a, взята з нічної культури (підрозділ II.5). Протягом 2 діб при температурі 37 °C утворився щільний шар бактерій, з помітними стерильними зонами. Трансгенні рослини проявили візуально помітну бактеріостатичну активність, як видно на рисунку 3.

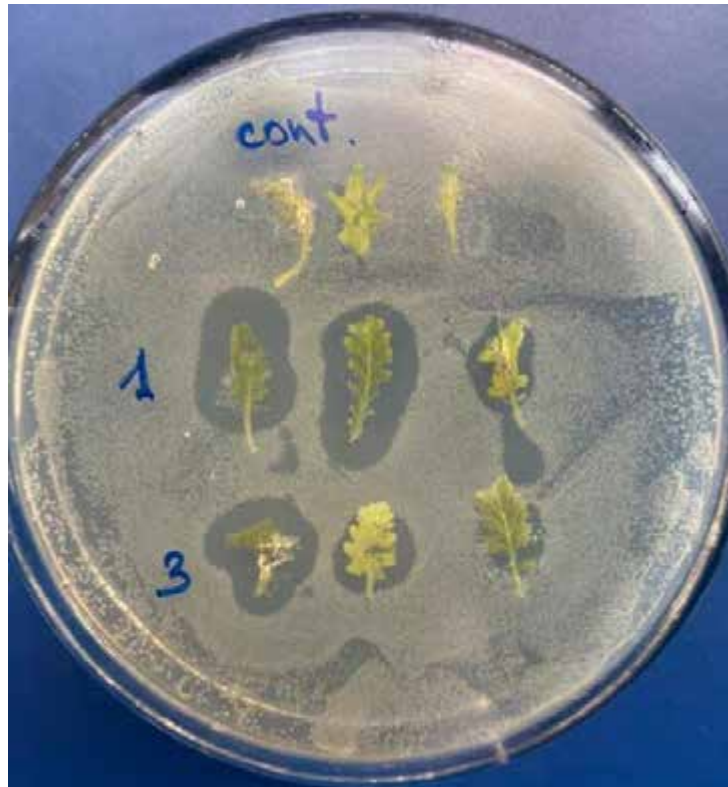


Рис. 3.12 Трансгенні листя на середовищі LB з *E. coli* DH5a

Аналогічні досліди було проведено з нетрансформованими рослинами, при тих самих умовах шар бактерій утворився на всій площині чашки Петрі, як видно на рисунку 3.

Для виконання спот тесту була отриманий екстракт з трансгенних рослин *Lactuca sativa* та *Brassica rapa var. niposinica* (підрозділ II.10) та підготовлені чашки Петрі з кишковою паличкою штаму DH5a на агаризованому середовищі LB. Спочатку суспензію наносили на середовищі і витримували протягом години. По закінченню часу на поверхню наносили рослинні екстракти трансгенних та нетрансгенних рослин (рис. 3.13).

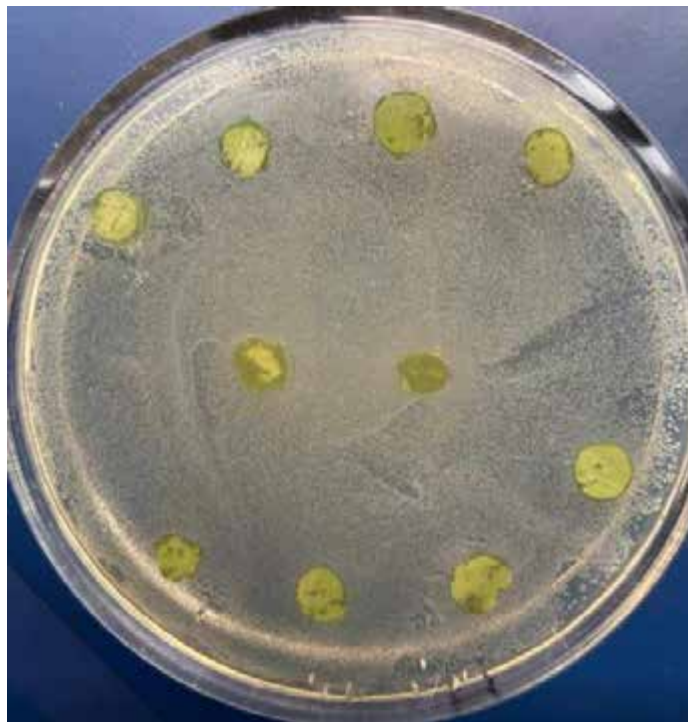


Рис.3.13 Нетрансгенні листові диски на LB з *E. coli* DH5a

Отримані чашки Петрі витримувались в термостаті 2 доби при температурі 37 °C. Як видно з рисунка 3.14, бактеріостатична дія проявляється тільки в трансгенній рослині, нетрансгенна рослина позначена «К».

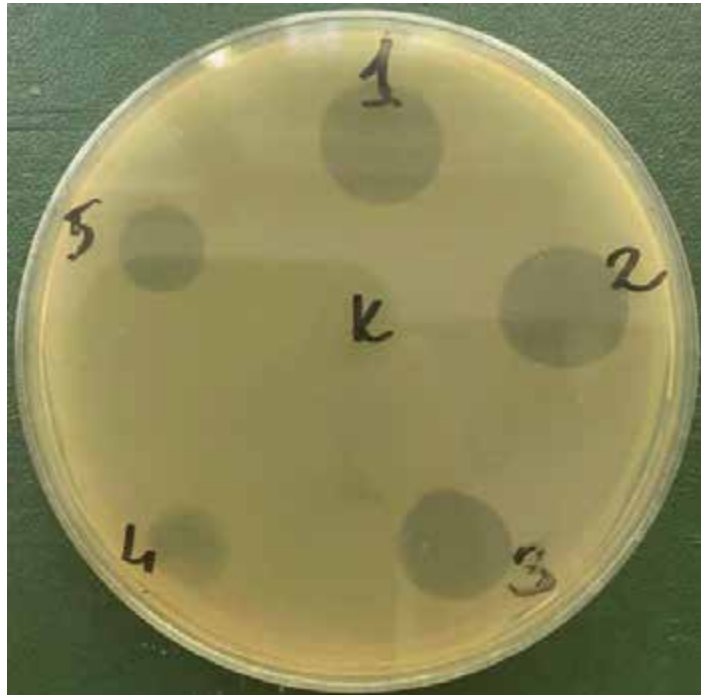


Рис. 3. 14 Spot тест з екстрактів трансгенних рослин

3.5 Трансгени та трансгенні ознаки у наступному поколінні трансформованих рослин *Lactuca sativa*

Lactuca sativa доволі швидко росте через короткий вегетаційний етап, також розмножується шляхом самозапилення, за рахунок чого легко отримати нащадків трансформованої рослини та проаналізувати розщеплення трансгенної ознаки у наступних поколіннях, а саме в F1.

Після стерилізації (підрозділ 2.6) посівний матеріал переносили в чашки Петрі з безгормональним МС з глюфосинатом амонію в концентрації 5 мг/л. На даному середовищі могли рости виключно рослини з переданою стійкістю до глюфосината амонію, інші рослини погано або зовсім не проростали й зрештою гинули. Експериментальні дані не демонструють класичне розщеплення 3:1, в даному випадку майже всі рослини-нащадки вирости, з 120 насінини проросло 103, що склало 91%. Різниця між рослинами, що успадакували трансгенну ознаку та не успадакували зображена на рисунку 3.15



Рис 3.15 Приклад розщеплення за трансгенною ознакою в *Lactuca sativa*

Результати дослідження можуть означати, що в результаті трансгенезу, інтеграція цільового гену відбулась в геном в декількох місцях.

3.6 Трансгени та трансгенні ознаки у наступному поколінні трансформованих рослин *Brassica rapa* var. *niposinica*

Brassica rapa var. *niposinica* також має однорічний цикл розвитку з швидким періодом вегетації, це самозапильна рослина. Саме тому можна швидко отримати друге покоління трансформованих мізун та перевірити наявність трансгену та трансгенних ознак. Насіння стерилізували та садили на безгормональне середовище МС з гербіцидом глюфосинатом амонію в якості селективного агента.

На відміну від трансгенного салату, в нащадків мізуни розділення за стійкістю до глюфосината амонію спостерігалось по класичному

розщепленню. В отриманій лінії було продемонстроване розщеплення 3:1, а саме 96 стійких і 24 нестійких (рис 3).

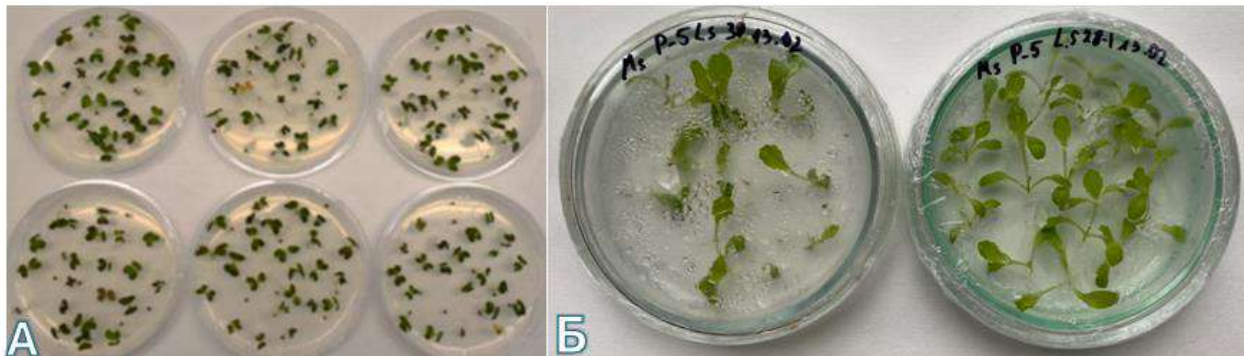


Рис Нащадки трансформованих рослин *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica*

Подібне розщеплення означає, що Т-ДНК інтегрувалась однокопійно в геном трансформованих рослин.

ВИСНОВКИ

При виконанні кваліфікаційної роботи були отримані трансгенні лінії рослин *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica*, з герелогічною експресією рекомбінантного білка коліцину М. Після молекулярно-біологічного аналізу, була доказана бактеріостатична дія против *E. coli* штаму DH5a в отриманих трансформованих рослин.

1. Для генетичної трансформації оптимально *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica* використовувати *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 з експресійною касетою pCB052.
2. Оптимальна схема регенерації експлантів *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica* на поживному середовищі МС з цефтріаксоном (2,5 мг/л) та глюфосинатом амонію (5 мг/л).
3. Ефективність генетичної трансформації *Lactuca sativa* після культивування на селективному середовищі B5R з глюфосинатом амонію склала 72%.
4. Ефективність генетичної трансформації *Brassica rapa* var. *niposinica* після культивування на селективному середовищі B5R з глюфосинатом амонію склала 64%.
5. Молекулярно-генетичні дослідження доказали інтеграцію вектору pCB052 в геном отриманих ліній *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica*.
6. Бактеріостатична активність трансгенних ліній *Lactuca sativa* та *Brassica rapa* var. *niposinica* була доведена методом Кірбі-Бауера.

Список використаних джерел

1. Marković KG, Grujović MŽ, Koraćević MG, Nikodijević DD, Milutinović MG, Djilas MD. Colicins and Microcins Produced by Enterobacteriaceae: Characterization, Mode of Action, and Putative Applications. *Int J Environ Res Public Health*. 2022.
2. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*. 2021.
3. Hahn-Löbmann S, Stephan A, Schulz S, Schneider T, Shaverskyi A, Tusé D, Giritch A, Gleba Y. Colicins and Salmocins - New Classes of Plant-Made Non-antibiotic Food Antibacterials. *Front Plant Sci*. 2019.
4. Łojewska, Ewelina & Sakowicz, Tomasz & Kowalczyk, Aleksandra & Konieczka, Magdalena & Grzegorzczak, Janina & Sitarek, Przemysław & Ewa, Skala & Czarny, Piotr & Sliwinski, Tomasz & Kowalczyk, Tomasz. Production of recombinant colicin M in *Nicotiana tabacum* plants and its antimicrobial activity. *Plant Biotechnology Reports*. 2019. 1-11.
5. Almon, E., Shaaltiel, Y., Sbeit, W., Fich, A., Schwartz, D., Waterman, M., et al. Novel orally administered recombinant anti-TNF alpha fusion protein for the treatment of ulcerative colitis: results from a phase 2a clinical trial. *J. Clin. Gastroenterol*. 2021.
6. Ananov, A. A., Suprun, A. R., Aleynova, O. A., Nityagovsky, N. N., Ogneva, Z. V., Dubrovina, A. S., et al. Effect of VaMyb40 and VaMyb60 overexpression on stilbene biosynthesis in cell cultures of grapevine *Vitis amurensis* Rupr. 2022
7. Burnett, M. J., Burnett, A. C. (). Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants People Planet* 2, 2020. 121–132.
8. Buyel, J. F., Twyman, R. M., Fischer, R. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. *Biotechnol. Adv.* 2015. 902–913

9. Chen, D., Mubeen, B., Hasnain, A., Rizwan, M., Adrees, M., Naqvi, S. A. H., et al. Role of promising secondary metabolites to confer resistance against environmental stresses in crop plants: Current scenario and future perspectives. *Front. Plant Sci.* 2022.
10. Chichester, J. A., Green, B. J., Jones, R. M., Shoji, Y., Miura, K., Long, C. A., et al. 2018. Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: A phase 1 dose-escalation study in healthy adults. 2018.
11. Damaj, M. B., Jifon, J. L., Woodard, S. L., Vargas-Bautista, C., Barros, G. O., Molina, J., et al. Unprecedented enhancement of recombinant protein production in sugarcane culms using a combinatorial promoter stacking system. 2020.
12. Dhakarey, R., Yaritz, U., Tian, L., Amir, R. A myb transcription factor, PgMyb308-like, enhances the level of shikimate, aromatic amino acids, and lignins, but represses the synthesis of flavonoids and hydrolyzable tannins, in pomegranate (*Punica granatum* L.). 2022.
13. Fox, J. First plant-made biologic approved. *Nat. Biotechnol.* 2012. 30, 472.
14. Gao, S. J., Damaj, M. B., Park, J. W., Beyene, G., Buenrostro-Nava, M. T., Molina, J., et al. Enhanced transgene expression in sugarcane by co-expression of virus-encoded RNA silencing suppressors. 2013. *PLoS One* 8.
15. Avesani, L., Merlin, M., Gecchele, E., Capaldi, S., Brozzetti, A., Falorni, A., et al. Comparative analysis of different biofactories for the production of a major diabetes autoantigen. 2013. *Transgenic Res.* 23.
16. Baur, A., Reski, R., Gorr, G. (). Enhanced recovery of a secreted recombinant human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum albumin in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnol. J.* 2005., 331–340.
17. Beringer, J., Chen, W., Garton, R., Sardesai, N., Wang, P., Zhou, N.,

et al. Comparison of the impact of viral and plant-derived promoters regulating selectable marker gene on maize transformation and transgene expression. 2017. *Plant Cell Rep.* 36, 519–528.

18. Boyle, P., Schwizer, S., Hind, S., Kraus, C., de la Torre Diaz, S., He, B., et al. Detecting n-myristoylation and s-acylation of host and pathogen proteins in plants using click chemistry. *Plant Methods.* 2016.

19. González, M. N., Massa, G. A., Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A. S., et al. (). Reduced enzymatic browning in potato tubers by specific editing of a polyphenol oxidase gene via ribonucleoprotein complexes delivery of the CRISPR/Cas9 system.. *Front. Plant Sci.* 2020.

20. Habibi, P., Prado, G. S., Pelegrini, P. B., Hefferon, K. L., Soccol, C. R., Grossi-de-Sa, M. F. Optimization of inside and outside factors to improve recombinant protein yield in plant. *Plant Cell Tissue. Organ Cult.* 2017, 449–467.

21. Han, W., Xu, J., Wan, H., Zhou, L., Wu, B., Gao, J., et al. Overexpression of BcERF3 increases the biosynthesis of saikosaponins in bupleurum chinense. *FEBS.* 2022.

22. Buntru, M., Vogel, S., Stoff, K., Spiegel, H., Schillberg, S. A versatile coupled cell-free transcription-translation system based on tobacco BY-2 cell lysates. *Biotechnol. Bioengineering.* 2015, 867–878.

23. Buyel, J., Fischer, R. Flocculation increases the efficacy of depth filtration during the downstream processing of recombinant pharmaceutical proteins produced in tobacco. *Plant Biotechnol. J.* 2013, 240–252.

24. Hossain, R., Quispe, C., Saikat, A. S. M., Jain, D., Habib, A., Janmeda, P., et al. Biosynthesis of secondary metabolites based on the regulation of microRNAs. *BioMed. Res.* 2022.

25. Jiang, M. C., Hu, C. C., Lin, N. S., Hsu, Y. H. Production of human IFN γ protein in nicotiana benthamiana plant through an enhanced expression system based on bamboo mosaic virus. *Viruses.* 2019.

26. Buyel, J. F., Fischer, R. A juice extractor can simplify the downstream processing of plant-derived biopharmaceutical proteins compared to blade-based homogenizers. *Process Biochem* 2015. 50, 859–866.
27. Castilho, A., Strasser, R., Stadlmann, J., Grass, J., Jez, J., Gattinger, P., et al. In Planta Protein sialylation through overexpression of the respective mammalian pathway. *J. Biol. Chem.* 2010. 285, 15923–15930.
28. Chanroj, S., Jaiprasert, A., Issaro, N. A novel technique for recombinant protein expression in duckweed (*Spirodela polyrhiza*) turions. *J. Plant Biotechnol.* 2021, 156–164.
29. Joung, Y. H., Choi, P. S., Kwon, S. Y., Harn, C. H. “Plant transformation methods and applications,” in *Current technologies in plant molecular breeding*, 2015. 297–343.
30. Kempinski, C., Chappell, J. Engineering triterpene metabolism in the oilseed of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol. J.* 17 2019, 386–396
31. Kumar, S. R., Rai, A., Bomzan, D. P., Kumar, K., Hemmerlin, A., Dwivedi, V., et al. A plastid-localized bona fide geranylgeranyl diphosphate synthase plays a necessary role in monoterpene indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant J.* 2020, 103, 248–265.
32. Li, X. H., Kim, J. K., Park, S. U. Heterologous expression of three transcription factors differently regulated astragalosides metabolic biosynthesis in *Astragalus membranaceus* hairy roots. *Plants* 11. 2022.
33. Chen, Q., Davis, K. The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. *F1000Research*. 2016.
34. Chen, Y., Wang, A., Zhao, L., Shen, G., Cui, L., Tang, K.. Expression of thymosin α 1 concatemer in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 52, 303, 2009.
35. Damaj, M., Jifon, J., Woodard, S., Vargas-Bautista, C., Barros, G., Molina, J., et al. Unprecedented enhancement of recombinant protein production in sugarcane culms using a combinatorial promoter stacking

system. *Sci. Rep.* 10, 2020.

36. Debler, J., Henares, B., Lee, R. Agroinfiltration for transient gene expression and characterisation of fungal pathogen effectors in cool-season grain legume hosts. *Plant Cell Rep.* 2021.

37. Diamos, A., Hunter, J., Pardhe, M., Rosenthal, S., Sun, H., Foster, B., et al. High level production of monoclonal antibodies using an optimized plant expression system. *Front. Bioengineering Biotechnol.* 2020.

38. Li, Q., Zhu, T., Zhang, R., Bu, Q., Yin, J., Zhang, L., et al.. Molecular cloning and functional analysis of hyoscyamine 6 β -hydroxylase (H6H) in the poisonous and medicinal plant *datura innoxia* mill. *Plant Physiol. Biochem.* 2020. 153, 11–19

39. Maharjan, P. M., Cheon, J., Jung, J., Kim, H., Lee, J., Song, M., et al. Plant-expressed receptor binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein elicits humoral immunity in mice. *Vaccines* 2021, 978

40. Malla, A., Rosales-Mendoza, S., Phoolcharoen, W., Vimolmangkang, S. Efficient transient expression of recombinant proteins using DNA viral vectors in freshwater microalgal species. *Front. Plant Sci.* 12. 2021.

41. Matsuo, K. CRISPR/Cas9-mediated knockout of the DCL2 and DCL4 genes in *nicotiana benthamiana* and its productivity of recombinant proteins. *Plant Cell Rep.* 2022.41,

42. Mulangu, S., Dodd, L. E., Davey, R. T., Jr., Tshiani Mbaya, O., Proschan, M., Mukadi, D., et al. A randomized, controlled trial of Ebola virus disease therapeutics. *N. Engl. J.* 2019. *Med.* 381, 2293–2303

43. Drakakaki, G., Marcel, S., Arcalis, E., Altmann, F., Gonzalez-Melendi, P., Fischer, R., et al. The intracellular fate of a recombinant protein is tissue dependent. *Plant Physiol.* 2006.141, 578–586.

44. Elmer, J., Harris, D., Sun, G., Palmer, A. Purification of hemoglobin by tangential flow filtration with diafiltration. *Biotechnol. Prog.* 2009. 25,

1402–1410

45. Fischer, R., Schumann, D., Zimmermann, S., Drossard, J., Sack, M., Schillberg, S. Expression and characterization of bispecific single-chain fv fragments produced in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* 1999. 262, 810–816
46. Garcia-Garcia, T., Poncet, S., Derouiche, A., Shi, L., Mijakovic, I., Noirot-Gros, M. Role of protein phosphorylation in the regulation of cell cycle and DNA-related processes in bacteria. *Front. Microbiol.* 2016.
47. Gitzinger, M., Parsons, J., Reski, R., Fussenegger, M. Functional cross-kingdom conservation of mammalian and moss (*Physcomitrella patens*) transcription, translation and secretion machineries. *Plant Biotechnol J.* 2009. 7, 73–86.
48. Gomord, V., Faye, L. (). Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004. 7, 171–181.
49. Gutiérrez, S. P., Saberianfar, R., Kohalmi, S. E., Menassa, R.. Protein body formation in stable transgenic tobacco expressing elastin-like polypeptide and hydrophobin fusion proteins. *BMC Biotechnol.* 2013. 13, 40.
50. Grosse-Holz, F., Madeira, L., Zahid, M. A., Songer, M., Kourelis, J., Fesenko, M., et al. Three unrelated protease inhibitors enhance accumulation of pharmaceutical recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnol J.* 2018. 16, 1797–1810.
51. Naseri, Z., Dorani Uliaei, E., Ofoghi, H., Davarpanah, S. J. Expression of novel lhmlt fusion protein using plant viral vector and study of its anticancer effect. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2020. 143, 97–108.
52. Paolino, K. M., Regules, J. A., Moon, J. E., Ruck, R. C., Bennett, J. W., Remich, S. A., et al. Safety and immunogenicity of a plant-derived recombinant protective antigen (rPA)-based vaccine against *Bacillus anthracis*: a phase 1 dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine* 40, 2022. 1864–1871.
53. Phakham, T., Bulaon, C. J. I., Khorattanakulchai, N., Shanmugaraj,

B., Buranapraditkun, S., Boonkrai, C., et al. Functional characterization of pembrolizumab produced in *Nicotiana benthamiana* using a rapid transient expression system. *Front. Plant Sci.* 12. 2021.

54. Mohebodini, M.; Jalali-Javaran, M.; Alizadeh, H.; Mahboudi, F.; Yarbakht, M. *Agrobacterium*-mediated transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to express igg-binding protein a and human pro-insulin as a fusion protein. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 2014, 89, 719–725.

55. Abiri, R.; Valdiani, A.; Maziah, M.; Shaharuddin, N.A.; Sahebi, M.; Yusof, Z.N.B.; Atabaki, N.; Talei, D. A critical review of the concept of transgenic plants: Insights into pharmaceutical biotechnology and molecular farming. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2015, 18, 21–42.

56. Chen, Y.; Wang, A.; Zhao, L.; Shen, G.; Cui, L.; Tang, K. Expression of thymosin α 1 concatemer in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2009, 52, 303–312.

57. Floss, D.M.; Mockey, M.; Zanello, G.; Brosseau, D.; Diogon, M.; Frutos, R.; Bruel, T.; Rodrigues, V.; Garzon, E.; Chevaleyre, C. Expression and immunogenicity of the mycobacterial ag85b/esat-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy. *BioMed Res. Int.* 2010, 2010, 274346.

58. Lakshmi, P.S.; Verma, D.; Yang, X.; Lloyd, B.; Daniell, H. Low cost tuberculosis vaccine antigens in capsules: Expression in chloroplasts, bio-encapsulation, stability and functional evaluation in vitro. *PLoS ONE* 2013, 8, e54708.

59. Koya, V.; Moayeri, M.; Leppla, S.H.; Daniell, H. Plant-based vaccine: Mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect. Immun.* 2005, 73, 8266–8274.

60. Lee, S.-J.; Park, C.-I.; Park, M.-Y.; Jung, H.-S.; Ryu, W.-S.; Lim, S.-M.; Tan, H.-K.; Kwon, T.-H.; Yang, M.-S.; Kim, D.-I. Production and characterization of human ctla4ig expressed in transgenic rice cell suspension

cultures. *Protein Expr. Purif.* 2007, 51, 293–302.

61. Chung, N.-D.; Kim, N.-S.; Jang, S.-H.; Oh, S.-M.; Jang, S.-H.; Kim, T.-G.; Jang, Y.-S.; Yang, M.-S. Production of functional human vascular endothelial growth factor165 in transgenic rice cell suspension cultures. *Enzym. Microb. Technol.* 2014, 63, 58–63.

62. Islam, M.R.; Kim, N.-S.; Jung, J.-W.; Kim, H.-B.; Han, S.-C.; Yang, M.-S. Spontaneous pepsin c-catalyzed activation of human pepsinogen c in transgenic rice cell suspension culture: Production and characterization of human pepsin c. *Enzym. Microb. Technol.* 2018, 108, 66–73.

63. Moon, K.-B.; Lee, J.; Kang, S.; Kim, M.; Mason, H.S.; Jeon, J.-H.; Kim, H.-S. Overexpression and self-assembly of virus-like particles in *Nicotiana benthamiana* by a single-vector DNA replicon system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98, 8281–8290.

64. Fujiuchi, N.; Matsuda, R.; Matoba, N.; Fujiwara, K. Effect of nitrate concentration in nutrient solution on hemagglutinin content of *Nicotiana benthamiana* leaves in a viral vector-mediated transient gene expression system. *Plant Biotechnol.* 2014, 31, 207–211.

65. Merlin, M.; Gecchele, E.; Arcalis, E.; Remelli, S.; Brozzetti, A.; Pezzotti, M.; Avesani, L. Enhanced gad65 production in plants using the magnicon transient expression system: Optimization of upstream production and downstream processing. *Biotechnol. J.* 2016, 11, 542–553.

66. Pogue, G.P.; Vojdani, F.; Palmer, K.E.; Hiatt, E.; Hume, S.; Phelps, J.; Long, L.; Bohorova, N.; Kim, D.; Pauly, M. Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant Biotechnol. J.* 2010, 8, 638–654.

67. Boothe, J.; Nykiforuk, C.; Kuhlman, P.; Whelan, H.; Pollock, W.; Clark, S.; Yuan, S.; Kumar, R.; Murray, E.; Visser, F. Analytical characterization, safety and clinical bioequivalence of recombinant human insulin from transgenic plants. In 69th Scientific Sessions; Abstract; American

Diabetes Association: Arlington County, VA, USA, 2009; Volume 5.

68. McPherson, M.A.; Yang, R.-C.; Good, A.G.; Nielson, R.L.; Hall, L.M. Potential for seed-mediated gene flow in agroecosystems from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) intended for plant molecular farming. *Transgenic Res.* 2009, 18, 281–299.

69. Zavaleta, N.; Figueroa, D.; Rivera, J.; Sánchez, J.; Alfaro, S.; Lönnnerdal, B. Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in Peruvian children with acute diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2007, 44, 258–264.

70. MacManus, C.F.; Collins, C.B.; Nguyen, T.T.; Alfano, R.W.; Jedlicka, P.; de Zoeten, E.F. Ven-120, a recombinant human lactoferrin, promotes a regulatory T cell [treg] phenotype and drives resolution of inflammation in distinct murine models of inflammatory bowel disease. *J. Crohn's Colitis* 2017, 11, 1101–1112.

71. Paul, M.; Reljic, R.; Klein, K.; Drake, P.M.; van Dolleweerd, C.; Pabst, M.; Windwarder, M.; Arcalis, E.; Stoger, E.; Altmann, F. Characterization of a plant-produced recombinant human secretory IgA with broad neutralizing activity against HIV. *mAbs* 2014, 6, 1585–1597.

72. Hiwasa-Tanase, K., Nyarubona, M., Hirai, T., Kato, K., Ichikawa, T., Ezura, H. High-level accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomatoes expressing a synthetic miraculin gene with optimized codon usage terminated by the native miraculin terminator. *Plant Cell Rep.* 2010. 30, 113–124.

73. Hiwasa-Tanase, K., Nyarubona, M., Hirai, T., Kato, K., Ichikawa, T., Ezura, H. High-level accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomatoes expressing a synthetic miraculin gene with optimized codon usage terminated by the native miraculin terminator. *Plant Cell Rep.* 2010. 30, 113–124.

74. Politch, J. A., Cu-Uvin, S., Moench, T. R., Tashima, K. T., Marathe,

J. G., Guthrie, K. M., et al. Safety, acceptability, and pharmacokinetics of a monoclonal antibody-based vaginal multipurpose prevention film (MB66): A phase I randomized trial. *PLoS Med.* 2021. 18.

75. Ramírez-Alanis, I. A., Renaud, J. B., García-Lara, S., Menassa, R., Cardineau, G. A. Transient co-expression with three O-glycosylation enzymes allows production of GalNAc-o-glycosylated granulocyte-colony stimulating factor in *N. benthamiana*. *Plant Methods.* 2018. 14, 1–14.

76. Sharma, D., Kulshreshtha, A., Kumar, R., Hallan, V. First report of natural infection of alternanthera yellow vein virus and cotton leaf curl multan betasatellite on a new host *Picrorhiza kurroa*, an important endangered medicinal herb. *J. Plant Pathol.* 2019. 101, 149–153.

77. Huang, L., Tan, C., Yeh, J., Liu, H., Liu, Y., Ho, S., et al. Efficient secretion of recombinant proteins from rice suspension-cultured cells modulated by the choice of signal peptide. *PloS One.* 2015. 10, e0140812.

78. Iribarren, P., Berazategui, M., Cazzulo, J., Alvarez, V. Biosynthesis of SUMOylated proteins in bacteria using the *Trypanosoma brucei* enzymatic system. *PloS One.* 2015. 10, e0134950.

79. Jeong, I., Lee, S., Bonkhofer, F., Tolley, J., Fukudome, A., Nagashima, Y., et al. Purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* oligosaccharyltransferase complexes from the native host: a protein super-expression system for structural studies. *Plant J.* 2018. 94, 131–145.

80. Raven, N.; Rasche, S.; Kuehn, C.; Anderlei, T.; Klöckner, W.; Schuster, F.; Henquet, M.; Bosch, D.; Büchs, J.; Fischer, R. Scaled-up manufacturing of recombinant antibodies produced by plant cells in a 200-L orbitally-shaken disposable bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2015, 112, 308–321.

81. Corbin, J.M.; Hashimoto, B.I.; Karuppanan, K.; Kyser, Z.R.; Wu, L.; Roberts, B.A.; Noe, A.R.; Rodriguez, R.L.; McDonald, K.A.; Nandi, S. Semicontinuous bioreactor production of recombinant butyrylcholinesterase in

transgenic rice cell suspension cultures. *Front. Plant Sci.* 2016, 7, 412.

82. Su, J.; Zhu, L.; Sherman, A.; Wang, X.; Lin, S.; Kamesh, A.; Norikane, J.H.; Streatfield, S.J.; Herzog, R.W.; Daniell, H. Low cost industrial production of coagulation factor ix bioencapsulated in lettuce cells for oral tolerance induction in hemophilia b. *Biomaterials* 2015, 70, 84–93.

83. Kashima, K.; Yuki, Y.; Mejima, M.; Kurokawa, S.; Suzuki, Y.; Minakawa, S.; Takeyama, N.; Fukuyama, Y.; Azegami, T.; Tanimoto, T. Good manufacturing practices production of a purification-free oral cholera vaccine expressed in transgenic rice plants. *Plant Cell Rep.* 2016, 35, 667–679.

84. Tabayashi, N.; Matsumura, T. Forefront study of plant biotechnology for practical use: Development of oral drug for animal derived from transgenic strawberry. *Soc. Biotechnol. J. Japn* 2014, 92, 537–539.

85. Kaldis, A., Ahmad, A., Reid, A., McGarvey, B., Brandle, J., Ma, S., et al. High-level production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures. *Plant Biotechnol. J.* 2013. 11, 535–545.

86. Tusé, D., Ku, N., Bendandi, M., Becerra, C., Collins, R., Langford, N., et al. Clinical safety and immunogenicity of tumor-targeted, plant-made id-KLH conjugate vaccines for follicular lymphoma. *Biomed. Res. Int.* 2015, 648143.

87. Adeolu M., Alnajar S., Naushad S., Gupta R.S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016;66:5575–5599.

88. Nataliia Shcherbak, Heike Prochaska, Kateryna Lystvan, Accumulation of colicin M protein and its biological activity in transgenic lettuce and mizuna plants. 2013.

89. Cameron A., Zaheer R., Adator E.H., Barbieri R., Reuter T., McAllister T.A. Bacteriocin occurrence and activity in *Escherichia coli*

isolated from bovines and wastewater. *Toxins*. 2019;11:475.

90. Cameron A., Zaheer R., Adator E.H., Barbieri R., Reuter T., McAllister T.A. Bacteriocin occurrence and activity in *Escherichia coli* isolated from bovines and wastewater. *Toxins*. 2019;11:475.

91. Nikodijević D.D., Milutinović M.G., Cvetković D.M., Čupurdija M.Đ., Jovanović M.M., Mrkić I.V., Jankulović-Gavrović M.Đ., Marković S.D. Impact of bee venom and melittin on apoptosis and biotransformation in colorectal carcinoma cell lines. *Toxin. Rev.* 2019;40:1272–1279.\

92. Arunmanee W., Ecoy G.A., Khine H.E., Duangkaew M., Prompetchara E., Chanvorachote P., Chaotham C. Colicin N mediates apoptosis and suppresses integrin-modulated survival in human lung cancer cells. *Molecules*. 2020;25:816.

93. Shu Y, Wan-Ting J, Ya-Ning Y, Yu-Han F. An Optimized CTAB Method for Genomic DNA Extraction from Freshly-picked Pinnae of Fern, *Adiantum capillus-veneris* L. *Bio Protoc*. 2018 Jul 5;8(13):e2906.

94. Cerritos-Garcia DG, Avery PB, Martini X, Candian V, Cano LM, Cave RD. In Vitro Effects of Leaf Extracts from *Brassica rapa* on the Growth of Two Entomopathogenic Fungi. *J Fungi (Basel)*. 2021 Sep 19;7(9):779.

95. Schwartz HS, Schioppacassi G, Kanter PM. Mechanisms of selectivity of intercalating agents. *Antibiot Chemother* (1971).

97. Furtado GL, Medeiros AA. Single-disk diffusion testing (Kirby-Bauer) of susceptibility of *Proteus mirabilis* to chloramphenicol: significance of the intermediate category. *J Clin Microbiol*. 1980 Oct;12(4):550-3.

ДОДАТОК

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ БАКАЛАВРСЬКОЇ РОБОТИ

1. Герасименко А.С. «БІОСИНТЕЗ ІНСЕКТИЦИДНИХ БІЛКІВ В РОСЛИНАХ ДЛЯ БОРОТЬБИ ЗІ ШКІДНИКАМИ». ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ В ЗАХИСТІ ТА КАРАНТИНІ РОСЛИН Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції здобувачів вищої освіти, присвяченій 126-річчю НУБіП України, 23 квітня 2024 р.

2. Герасименко А.С. «БІОСИНТЕЗ В РОСЛИНАХ РЕКОМБІНАНТНОГО КОЛІЦИНУ М ТА ЙОГО АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ» Х МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ, 24-25 квітня, 2024.

3. Герасименко А.С. «БІОСИНТЕЗ КОЛІЦИНУ М У РОСЛИНАХ: НОВІ ПЕРСПЕКТИВИ ДЛЯ БОРОТЬБИ З БАКТЕРІАЛЬНИМИ ІНФЕКЦІЯМИ» Х ВСЕУКРАЇНСЬКА НАУКОВОПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ ТА МОЛОДИХ ВЧЕНИХ «БІОТЕХНОЛОГІЯ: ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ», 2-3 травня, 2024.