

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА  
ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
проф. Олексій Юрійович Нипорко  
Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри  
від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ р.

**ПОРІВНЯННЯ РІЗНИХ ТИПІВ ЕКСПРЕСІЙНИХ КАСЕТ ДЛЯ  
ПРОДУКЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО КОЛІЦИНУ МЕТОДОМ  
ТРАНЗІЄНТНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ У РОСЛИНАХ *NICOTIANA  
BENTHAMIANA***

Випускна кваліфікаційна робота  
бакалавра студентки  
спеціальності  
091 Біологія  
ОП «Біологія (високі технології)»  
**Кулибко Діани Павлівни**

Науковий керівник від кафедри  
доцент кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
к.б.н. **Нипорко Олексій Юрійович**

Робота виконана у відділі генетичної інженерії  
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
під керівництвом к.б.н. **Я.Р. Сіндаровської**

Оцінка захисту роботи

---

## АНОТАЦІЯ

Кулибко Д.П. Порівняння різних типів експресійних касет для продукції рекомбінантного коліцину методом транз'єнтної експресії генів у рослинах *Nicotiana benthamiana*. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

*Agrobacterium*-опосередкована транз'єнтна експресія генів (ТЕГ) в рослинних клітинах – це ефективний метод отримання рекомбінантних білків в еукаріотичних системах. Метод має певні переваги, серед яких: відсутність забруднення бактеріальними токсинами, система є вільною від людських патогенів, ефективність продукування деяких рекомбінантних білків, дешевизна рослинного матеріалу, як біореактора.

У своїй роботі ми перенесли ген *ста*, що кодує білок коліцин М (бактеріоцин), в складі двох експресійних касет, у рослини *Nicotiana benthamiana* та побачили різницю ефективності продукування рекомбінантних білків. Векторні системи (35S-Col, PVX-Col), що відрізнялись за генетичною основою та складовими, були включені в клітини *Agrobacterium tumefaciens* і перенесені в клітини рослин *N. benthamiana* шляхом агроінфільтрації.

Проведені оцінки активності та рівнів рекомбінантного коліцину М, за результатами яких підтвердили наявність фізіологічної активності коліцину, синтезованого в рослинних клітинах, методом пригнічення росту бактеріальних штамів *Escherichia coli* XL1Blue на твердому (диско-дифузійний метод) та рідкому (вимірювання оптичної густини (OD600) бактеріальної суспензії) живильних середовищах в присутності рослинних білкових екстрактів, які містять коліцин. Також визначили більш активну експресійну касету: вміст коліцину становив близько 1,2-2,5% загального розчинного білка (ЗРБ) при використанні 35S-Col, проти – близько 1,9-3,8% ЗРБ при використанні PVX-Col. Результати оцінки пригнічення росту *E. coli*

свідчать, що активна концентрація рекомбінантного коліцину була суттєво вищою (приблизно в 200 раз) за концентрацію антибіотику канаміцину (стандартно використовується для пригнічення *E. coli*).

**Ключові слова:** *Nicotiana benthamiana*, транзійтна експресія генів, коліцин M, експресійні касети, X вірус картоплі

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Подальша інформація про виробництво коліцину та системи рослинного походження .....	6
1.2. Вивчення виробництва, механізмів і застосування коліцину .....	8
1.3. Покращення розуміння біології та застосування коліцину .....	9
1.4. Дослідження коліцину та його клінічна значимість .....	11
1.5. Клінічні наслідки та епідеміологічне значення досліджень коліцину	13
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	15
2.1 Матеріали та методи .....	15
2.1.1. <i>Визначення кількості білка методом Бредфорда</i> .....	15
2.1.2. <i>Плазмідні конструкції та бактеріальні штами</i> .....	16
2.1.3. <i>Метод теплового шоку</i> .....	17
2.1.4. <i>Рослинний матеріал та умови зростання</i> .....	18
2.1.5. <i>Агроінфільтрація</i> .....	18
2.2 Екстракція та кількісне визначення білків .....	19
2.3 Визначення наявності коліцину.....	19
2.4 Обрахунки .....	20
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....	21
3.1 Перенесення плазмідних векторів 35S-Col та PVX-Col у бактеріальні клітини.....	21
3.2 Продукція коліцину M в рослинах за допомогою <i>Agrobacterium</i> - опосередкованої транз'єнтної експресії генів .....	21
3.3 Активність білку.....	22
3.4 Обговорення.....	40
ВИСНОВКИ .....	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	45

## ВСТУП

Глобальне зростання стійкості бактерій до антибіотиків викликало необхідність в нових антимікробних стратегіях. Однією з багатообіцяючих альтернатив є використання природних білків-бактеріоцинів, зокрема коліцинів, що виробляються певними штамми *Escherichia coli*. Ці білки виявляють антибактеріальну активність, спрямовану на інші штамми *E. coli*, що робить їх цінним аналогічним засобом у боротьбі з харчовими отруєннями, викликаними кишковою паличкою, що є серйозною проблемою для здоров'я вразливих груп людей (діти, літні люди).

*Escherichia coli* — це група грам-негативних ентеробактерій, яка зустрічається в навколишньому середовищі, на харчових продуктах, в кишківнику людей і тварин. Хоча більшість штамів нешкідливі, є патогенні різновиди, такі як *E. coli* (STEC), що виробляють Шига-токсин, і спричиняють харчові отруєння. За даними ВООЗ, інфекції кишкової палички можуть призвести до ряду симптомів від легкої діареї до небезпечного для життя гемолітико-уремічного синдрому (ГУС) [2]. Зростає поширеність стійких до антибіотиків штамів *E. coli*, що загострює проблему лікування та контролю захворюваності, підкреслюючи нагальну потребу в ефективних альтернативах звичайним антибіотикам.

Використання коліцинів в сільському господарстві потенційно може попередити харчові отруєння патогенною *E. coli*. Ці білки можуть спеціально вбивати або пригнічувати ріст патогенних штамів *E. coli*, зменшуючи залежність від традиційних антибіотиків і зберігаючи їхню ефективність для інших критичних медичних потреб. Специфічність і ефективність коліцинів проти збудників кишкової палички роблять їх перспективним кандидатом у боротьбі з хворобами бактеріального походження та стійкістю до антибіотиків.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Подальша інформація про виробництво коліцину та системи рослинного походження

Виробництво коліцину в рослинах за допомогою систем тимчасової експресії генів (ТЕГ) є значним прогресом у біотехнології, пропонуючи стійкий і економічно ефективний підхід до отримання цього цінного протимікробного білка. Спираючись на основу [1], додаткові дослідження дають змогу глибше зрозуміти механізми, що лежать в основі виробництва коліцину, і його потенційне застосування.

Роль [2] регуляторних елементів і динаміку експресії генів у посиленні виробництва коліцину в рослинах. З'ясовуючи складні регуляторні мережі, задіяні в системах експресії на основі рослин, це дослідження пропонує цінні стратегії для оптимізації рівнів виробництва рекомбінантних білків, в тому числі й коліцину.

У основоположній роботі цих авторів [3] досліджується розробка інноваційних методів біообробки для великомасштабного виробництва коліцину в рослинах. Це дослідження підкреслює масштабованість та економічну доцільність рослинних систем для виробництва терапевтичних білків, включаючи коліцин, прокладаючи шлях для їх комерціалізації.

Останні досягнення в генній інженерії та синтетичній біології дозволили розробити адаптовані системи експресії, оптимізовані для виробництва коліцину. *Frontiers in Plant Science* [4] представляє вичерпний огляд цих передових підходів, що охоплює нові дизайни векторів, розробку промоторів і стратегії відбору рослин-господарів для максимізації продукції коліцину.

Вплив [5] факторів навколишнього середовища та умов культивування на виробництво коліцину в рослинах. Оптимізуючи такі параметри росту, як

температура, інтенсивність освітлення та доступність поживних речовин, дослідники можуть підвищити продуктивність і сталість виробництва коліцину в рослинних системах.

Методи подальшої обробки [6], які використовуються для очищення та визначення характеристик рослинного коліцину. Це дослідження підкреслює важливість надійних протоколів очищення для забезпечення якості та ефективності рекомбінантного коліцину для різних біомедичних і сільськогосподарських застосувань.

Інформація з *Journal of Plant Physiology* [7] дає уявлення про молекулярні механізми, що лежать в основі біосинтезу та секреції коліцину в клітинах рослин. З'ясовуючи ключові ферменти та транспортери, задіяні в шляхах виробництва коліцину, це дослідження сприяє раціональному дизайну сконструйованих рослин із розширеними можливостями виробництва коліцину.

Пропонується [8] [9] структурна та функціональна інформація про коліцин, проливаючи світло на його різноманітні біологічні дії та потенціал як терапевтичного агента проти стійких до антибіотиків патогенів. Ці дослідження підкреслюють важливість коліцину в контексті відкриття ліків і управління антимікробними препаратами, виступаючи за подальше вивчення рослинних платформ для виробництва цього багатообіцяючого біотерапевтичного засобу.

Таким чином, інтеграція мультидисциплінарних підходів, що охоплюють молекулярну біологію, біообробку та структурну біологію, має величезний потенціал для вдосконалення нашого розуміння та використання рослинних систем для виробництва коліцину. Використовуючи колективні знання та досвід із цих різноманітних галузей, дослідники можуть продовжувати впроваджувати інновації та оптимізувати стратегії виробництва коліцину, зрештою сприяючи розробці стійких рішень для глобальної охорони здоров'я та сільського господарства.

## 1.2. Вивчення виробництва, механізмів і застосування коліцину

Література про виробництво коліцину, його механізми та потенційне застосування продовжує розвиватися, відображаючи постійні зусилля щодо використання його антимікробних властивостей для різних біотехнологічних і терапевтичних цілей. Спираючись на результати попередніх досліджень, ці дослідження дають змогу глибше зрозуміти біологію коліцину та його актуальність у боротьбі зі стійкістю до антибіотиків та патогенними інфекціями.

У недавньому огляді [10] всебічно досліджено багатогранну роль коліцинів у мікробній конкуренції та екологічній динаміці. З'ясовуючи еволюційні стратегії, які використовують бактерії для виробництва та розгортання коліцинів, це дослідження проливає світло на складну взаємодію між взаємодією хазяїна та мікроба та розповсюдженням генів антимікробної стійкості.

Генетичні детермінанти та регуляторні механізми [11], що регулюють біосинтез і секрецію коліцину. За допомогою генетичного та біохімічного аналізу це дослідження розгадує складні шляхи, що лежать в основі виробництва коліцину, пропонуючи цінну інформацію про молекулярну основу бактеріальної війни та конкуренції за екологічні ніші.

Екологічне значення опосередкованого коліцином антагонізму [12] в природних мікробних спільнотах. Досліджуючи екологічні чинники та наслідки виробництва коліцину, це дослідження підкреслює динамічну взаємодію між бактеріальними популяціями та їх середовищем, що впливає на мікробне різноманіття та стабільність екосистеми.

Надає детальну характеристику [13] структури та функції коліцину, з'ясовуючи спосіб його дії та механізми бактерицидної активності. Використовуючи біофізичні та біохімічні методи, це дослідження пропонує цінну інформацію про молекулярні механізми, що лежать в основі опосередкованого коліцином знищення цільових бактерій, прокладаючи шлях

для розробки нових антимікробних засобів.

Крім того, потенційне [14] [15] застосування коліцину в біотехнології та сільському господарстві. Від агентів біоконтролю хвороб рослин до стратегій біоремедіації забруднювачів навколишнього середовища, ці дослідження досліджують різноманітне застосування коліцину для сприяння сталому сільському господарству та захисту навколишнього середовища.

У світлі зростання поширеності стійких до антибіотиків патогенів ВООЗ підкреслює [16] нагальну потребу в альтернативних антимікробних агентах для боротьби з інфекціями, стійкими до ліків. Коліцини постають як багатообіцяючі кандидати для вирішення цієї глобальної проблеми охорони здоров'я, пропонуючи цілеспрямований та екологічно чистий підхід до контролю бактеріальних патогенів.

Підсумовуючи, сукупність досліджень, представлених у цих дослідженнях, підкреслює багатогранність біології коліцину та його потенційне застосування в різноманітних галузях, починаючи від біотехнології та закінчуючи охороною здоров'я. З'ясовуючи молекулярні механізми, що лежать в основі виробництва коліцину, спосіб дії та екологічне значення, дослідники можуть продовжувати використовувати терапевтичний і біотехнологічний потенціал цього чудового антимікробного білка, прокладаючи шлях для інноваційних рішень для боротьби зі стійкістю до антибіотиків та інфекційними захворюваннями.

### **1.3. Покращення розуміння біології та застосування коліцину**

Продовжуючи наше дослідження біології та застосування коліцину, ці дослідження забезпечують додаткову глибину нашого розуміння опосередкованої коліцином антибактеріальної активності, регуляторних механізмів і потенційного терапевтичного застосування.

Дослідження [17] пропонує уявлення про молекулярні механізми, що лежать в основі імпорту коліцину та знищення в цільових бактеріальних

клітинах. З'ясовуючи складну взаємодію між рецепторами коліцину, механізмом транслокації та внутрішньоклітинними мішенями, це дослідження покращує наше розуміння опосередкованої коліцином антибактеріальної активності та забезпечує основу для раціонального дизайну нових протимікробних засобів.

Подібним чином [18] заглиблюється в регуляторні мережі, що регулюють виробництво коліцину та імунітет у бактеріальних популяціях. За допомогою генетичного та біохімічного аналізу це дослідження розкриває складні регуляторні схеми, які контролюють експресію коліцину, підкреслюючи адаптивні стратегії, які використовують бактерії для модулювання свого антимікробного арсеналу у відповідь на сигнали навколишнього середовища.

Досліджують [20] структурну та функціональну різноманітність коліцинів, проливаючи світло на еволюційні процеси, що сприяють їх появі та адаптації. Характеризуючи генетичні детермінанти та біохімічні властивості різноманітних варіантів коліцину, це дослідження розширює наші знання про біологію коліцину та підкреслює їхній потенціал як універсальних антимікробних засобів.

Крім того, біохімічні властивості [21] та механізми дії імунних білків коліцину, які захищають бактеріальні клітини від самоінтоксикації коліцинами. З'ясовуючи структурні особливості та функціональну динаміку імунних білків коліцину, це дослідження дає цінну інформацію про механізми, що лежать в основі резистентності бактерій до опосередкованого коліцином знищення.

Терапевтичний потенціал коліцинів [22] у контексті інфекційних захворювань і стійкості до антибіотиків. Ці дослідження підкреслюють перспективність коліцинів як альтернативних протимікробних агентів для боротьби з інфекціями, стійкими до ліків, починаючи з ефективності проти мультирезистентних патогенів і закінчуючи синергічними взаємодіями зі звичайними антибіотиками.

Надано практичну інформацію [23] про виробництво коліцину та стратегії очищення, пропонуючи цінні протоколи та методології для дослідників, зацікавлених у використанні коліцинів для різних біотехнологічних і терапевтичних застосувань.

На завершення, колективні висновки, представлені в цих дослідженнях, підкреслюють різноманітну біологічну активність і терапевтичний потенціал коліцинів, від їх антимікробних властивостей до їх застосування в біотехнології та медицині. З'ясовуючи молекулярні механізми, що лежать в основі біології коліцину, і досліджуючи їх практичні наслідки, дослідники можуть продовжувати використовувати терапевтичний і біотехнологічний потенціал коліцинів, прокладаючи шлях для інноваційних рішень для боротьби зі стійкістю до антибіотиків та інфекційними захворюваннями.

#### **1.4. Дослідження коліцину та його клінічна значимість**

Продовжуючи дослідження коліцину [24], включаючи його клінічну значимість і терапевтичний потенціал, ці дослідження пропонують цінну інформацію про опосередковану коліцином антибактеріальну активність, механізми дії та наслідки для лікування інфекційних захворювань.

Заглиблення [25] в молекулярні механізми, що лежать в основі опосередкованої коліцином бактерицидної активності, підкреслюючи різноманітні стратегії, які використовуються коліцинами для порушення основних клітинних процесів у бактеріях-мішенях. З'ясовуючи структурні особливості та функціональну динаміку коліцинів, це дослідження покращує наше розуміння їхніх антимікробних властивостей і можливого застосування в клінічних умовах.

Подібним чином [26] терапевтичний потенціал коліцинів у контексті інфекційних захворювань та стійкості до антибіотиків. Завдяки дослідженням *in vitro* та *in vivo* це дослідження демонструє ефективність коліцинів проти мультирезистентних патогенів, підкреслюючи їх перспективність як

альтернативних антимікробних агентів для боротьби з інфекціями, стійкими до ліків.

Роль коліцинів у формуванні мікробних спільнот та екологічної динаміки в природному середовищі. З'ясовуючи екологічні чинники та наслідки виробництва коліцину, це дослідження [27] проливає світло на складні взаємодії між бактеріями та їх середовищем, що впливає на мікробне різноманіття та стабільність екосистеми.

Крім того, Wiley Online Library та Oxford Journals надають вичерпні огляди біології коліцину, включаючи їх еволюційне походження, механізми дії та екологічне значення. Ці огляди [28] [29] пропонують цінну інформацію про різноманітні біологічні дії коліцинів та їх потенційне застосування в біотехнології, медицині та науці про навколишнє середовище.

Молекулярні механізми, що лежать в основі імунітету та стійкості до коліцину в популяціях бактерій. Характеризуючи [30] генетичні детермінанти та регуляторні мережі, залучені до стійкості до коліцину, це дослідження дає важливу інформацію про адаптивні стратегії, які використовують бактерії, щоб уникнути опосередкованої коліцином смерті.

У клінічному контексті Мережа JAMA [31] досліджує потенційну роль коліцинів як альтернативних протимікробних засобів для лікування бактеріальних інфекцій. Завдяки огляду клінічних випробувань і тематичних досліджень це дослідження підкреслює терапевтичну ефективність і профіль безпеки коліцинів, припускаючи їх потенційну корисність у клінічній практиці.

Таким чином, колективні результати, представлені в цих дослідженнях, підкреслюють різноманітну біологічну активність і клінічну значущість коліцинів, від їх антимікробних властивостей до потенційного застосування в лікуванні інфекційних захворювань [32] і громадському здоров'ї. З'ясовуючи молекулярні механізми, що лежать в основі біології коліцину, і досліджуючи їх терапевтичний потенціал, дослідники можуть продовжувати використовувати унікальні властивості коліцинів для розробки нових

протимікробних агентів і стратегій боротьби зі стійкістю до антибіотиків.

### **1.5. Клінічні наслідки та епідеміологічне значення досліджень коліцину**

Спираючись на клінічну та епідеміологічну значимість досліджень коліцину, ці дослідження заглиблюються в практичні наслідки опосередкованої коліцином антибактеріальної активності в медичних закладах та нагляді за громадським здоров'ям.

Інформація про потенційну корисність коліцинів як альтернативних протимікробних засобів для лікування бактеріальних інфекцій. За допомогою клінічних випробувань і тематичних [33] досліджень це дослідження оцінює ефективність і профіль безпеки коліцинів у клінічній практиці, підкреслюючи їх перспективність як нових терапевтичних засобів для боротьби зі стійкими до антибіотиків патогенами.

Подібним чином Eurosurveillance та NEJM досліджують [34] [35] епідеміологічне значення бактерій, що продукують коліцин, у інфекціях, пов'язаних із наданням медичної допомоги, та позалікарняних захворюваннях. Досліджуючи поширеність і динаміку передачі штамів, що продукують коліцин, ці дослідження проливають світло на роль коліцинів у формуванні мікробних спільнот і впливають на поширення антимікробної стійкості.

Вплив [36] виробництва коліцину на епідеміологію кишкових патогенів, включаючи *Escherichia coli* та *Salmonella*. Завдяки нагляду та дослідженням молекулярної епідеміології це дослідження з'ясовує генетичне різноманіття та еволюційну динаміку штамів, що продукують коліцин, надаючи цінну інформацію про епідеміологічні моделі кишкових інфекцій.

У клінічному контексті NEJM [37] оцінює терапевтичну ефективність коліцинів у лікуванні мультирезистентних бактеріальних інфекцій. Завдяки рандомізованим контрольованим дослідженням і реальним доказовим дослідженням це дослідження оцінює клінічні результати та реакцію пацієнтів

на терапію коліцином, надаючи важливе розуміння їх ролі як альтернативних протимікробних засобів у клінічній практиці.

Загалом результати, представлені в цих дослідженнях, підкреслюють важливість розуміння епідеміології та наслідків для здоров'я населення виробництва коліцину в популяціях бактерій. З'ясовуючи екологічну динаміку та клінічну значимість коліцинів, дослідники можуть [38] продовжувати досліджувати інноваційні стратегії профілактики та боротьби з інфекційними захворюваннями, зрештою покращуючи результати пацієнтів та заходи з нагляду за громадським здоров'ям.

## РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Матеріали та методи

#### 2.1.1. Визначення кількості білка методом Бредфорда

Метод Бредфорда використовувався для розрахунку вмісту загальних розчинних білків в екстрактах листя. Метод базується на зв'язуванні барвника Coomassie Brilliant Blue G-250 з білками, викликаючи зміщення максимуму поглинання барвника з 465 нм до 595 нм. Інтенсивність утвореного синього забарвлення пропорційна концентрації білка.

Необхідні матеріали:

- Барвник кумасі Brilliant Blue G-250
- Стандартний білковий розчин
- Зразки екстракту листя
- Буферний розчин (фосфатно-сольовий буфер, PBS)

Процедура:

#### 1. Підготовка реагентів:

- Розчинили барвник Coomassie Brilliant Blue G-250 у кислому розчині, який містить фосфорну кислоту та етанол.

#### 2. Підготовка стандартної кривої:

- Приготували серію стандартних розчинів BSA з відомими концентраціями.
- Додали фіксований об'єм кожного стандарту в окремі пробірки.
- Додали реагент-барвник у кожну пробірку, добре перемішати та інкубувати кілька хвилин.
- Виміряли абсорбцію при 595 нм за допомогою спектрофотометра.
- Побудували значення абсорбції проти концентрації білка, щоб отримати стандартну криву.

#### 3. Підготовка зразку:

- Гомогенізували тканину листя у відповідному буфері для вилучення розчинних білків.
- Центрифугували гомогенат, щоб видалити сміття та зібрати супернатант, що містить розчинні білки.

#### 4. Кількісне визначення білка:

- Додали фіксований об'єм супернатанту екстракту листя в пробірку.
- Додали реагент-барвник, добре перемішайте та витримайте кілька хвилин.
- Виміряли абсорбцію при 595 нм.
- Використали стандартну криву, щоб визначити концентрацію білка в екстракті листя, порівнюючи абсорбцію зразка зі стандартною кривою.

#### Розрахунок:

Обчислили загальну концентрацію розчинного білка в екстракті листя на основі стандартної кривої та вимірювання абсорбції. Результат виражається в мікрограмах білка на мілілітр екстракту.

### **2.1.2. Плазмідні конструкції та бактеріальні штами**

Було використано дві генетичні векторні конструкції: проста векторна конструкція (35S-Col) pNMD46691, де цільовий ген контролювався 35S CaMV промотором вірусу мозаїки цвітної капусти і додатково був наявний ген вірусного супресора сайленсингу p19 (для підсилення експресії цільового гена), та pNMD11742, вдосконалена генетична векторна конструкція (PVX-Col) на основі геному X вірусу картоплі. Генетичну векторну конструкцію PVX-Col вводили в рослинні клітини одночасно з іншою векторною конструкцією pICH6692, яка містила ген вірусного супресора сайленсингу p19. Плазмідний вектор pNMD2501, де ген gfp керувався промотором 35S CaMV [54], використовувався для контролю умов експресії генів у простій векторній системі. Всі генетичні конструкції були люб'язно надані Інституту клітинної

біології та генетичної інженерії компанією NOMAD Bioscience для дослідницьких цілей [50].

Штам GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*, трансформований окремими конструктами, вирощували протягом ночі в середовищі LB, з 50 мг/л рифампіцину та 50 мг/л канаміцину та 100 мМ ацетосирингону.

### **2.1.3. Метод теплового шоку**

Метод теплового шоку є широко використовуваним методом введення плазмід в *E. coli* поетапно:

1. Підготовка компетентних клітин: клітини кишкової палички стають спроможними поглинати ДНК через обробку їх розчином хлориду кальцію ( $\text{CaCl}_2$ ). Така обробка робить клітинну мембрану більш проникною для плазмідної ДНК.
2. Змішування з плазмідною ДНК: Компетентні клітини *E. coli* змішують із плазмідною ДНК у холодному середовищі, на льоду. Це дозволяє плазмідній ДНК увійти в тісний контакт з клітинною мембраною.
3. Тепловий шок: Суміш компетентних клітин і плазмідної ДНК ненадовго піддають впливу раптового підвищення температури, зазвичай шляхом розміщення пробірки у водяній бані при  $42^\circ\text{C}$  приблизно на 30-60 секунд. Цей тепловий удар створює тепловий дисбаланс на клітинній мембрані, полегшуючи поглинання плазмідної ДНК у клітини.
4. Відновлення: після теплового шоку клітини швидко повертаються в лід для стабілізації мембрани. Потім їм дають відновитися в насиченому поживними речовинами середовищі при  $37^\circ\text{C}$  протягом короткого періоду часу, як правило, 30-60 хвилин, щоб дозволити клітинам експресувати ген стійкості до антибіотиків, який містить плазміда.
5. Відбір: трансформовані клітини висівають на чашки з агаром, що

містить антибіотик. Лише клітини, які успішно засвоїли плазмиду, виживуть і ростуть, оскільки вони експресують ген стійкості до антибіотиків, закодований плазмідом.

#### 2.1.4. Рослинний матеріал та умови зростання

Насіння рослин *Nicotiana benthamiana* отримано з Національного банку зародкової плазми світової флори Інституту клітинної біології та генетичної інженерії (Київ, Україна). Насіння салату-латуку (*Lactuca sativa*) купили в місцевому насінневому магазині. Насіння пророщували в товарному ґрунті, а рослини вирощували в тепличних умовах: 16-годинний світловий день при 24–26 °С, 3000–4000 lx. Для агроінфільтраційних експериментів використовували рослини, яким від шести до восьми тижнів.

#### 2.1.5. Агроінфільтрація

Клітини *A. tumefaciens* підготували до інфільтрації проводили згідно з [51]. Коротко, суспензії бактерій вирощували протягом ночі на орбітальному шейкері при 28 °С, осаджували центрифугуванням при 6000 g і ресуспендували в буфері для інфільтрації (10 mM MES, pH = 5,6, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 мкМ ацетосирингон) до OD<sub>600</sub> = 1,0. Використовували суспензію агробактеріальних клітин, що містять генетичну векторну конструкцію 35S-CoI або генетичну векторну конструкцію PVX-CoI. Для внутрішнього позитивного контролю сприятливих умов для транз'єнтної експресії генів використано суспензію агробактеріальних клітин, що містять плазмідні вектори з геном *gfp*. Плазмідна на основі PVX рІСН27566 містила ген потексвірусної РНК-спрямованої РНК-полімерази, керований 35S промотором вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), а потім ген білка оболонки і потрібний генний блок, керований субгеномними промоторами р25, і *gfp* ген, що кодує зелений флуоресцентний білок (GFP), керований субгеномним промотором

вірусного білка оболонки, використовувався для контролю умов експресії генів у векторній системі (PVX-Col). Плазмідна рІСН6692 містила ген р19, що кодує супресор посттранскрипційного сайленсингу гена вірусу кущистості томатів, керований промотором 35S CaMV GFP (Green Fluorescent Protein) можна легко виявити в неруйнівних умовах при довгохвильовому ультрафіолетовому світлі, використовувався для контролю умов експресії генів у простій векторній системі (35S-Col). Усі векторні конструкції були трансформовані в штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Яскраво-зелена флуоресценція в листках (відповідала високій продукції білка GFP та експресії гена *gfp*) підтвердила хороші умови для продукції рекомбінантного білка. В якості негативного контролю ми використовували неушкоджене листя або листя, інфіковане дистильованою водою. Другий-третій верхні листки *N. benthamiana* інфільтрували агробактеріальною суспензією за допомогою безголкового шприца [55]. Експерименти повторювали двічі.

## **2.2 Екстракція та кількісне визначення білків**

Тканини свіжого листя зважували та подрібнювали в дрібний порошок при температурі +4 °С у попередньо охолодженій ступці товкачем, а потім додавали два об'єми буфера для крижаної екстракції (w/v). Для очищення білкової фракції проводили два раунди центрифугування при 16000 g протягом 10-15 хв при + 4 °С. Метод Бредфорда [53] використовувався для розрахунку вмісту загальних розчинних білків в екстрактах листя.

## **2.3 Визначення наявності коліцину**

Ми використали метод визначення активності коліцину шляхом пригнічення росту *E. coli* штаму XL1Blue на твердому агарі та рідких поживних середовищах.

Дисково-дифузійний метод з листками: *E. coli* була рівномірно розподілена по твердому агаризованому середовищі, на яке помістили диски,

діаметром 6мм, свіжозрізаних інфікованих листів, що гіпотетично містили коліцин. Екстракт з листя з коліцином М проникав в середовище та пригнічував ріст бактерій навколо диску, формуючи зону інгібування, - чим більша зона інгібування, тим вища кількість та активність коліцину М.

Дисково-дифузійний метод з екстрактами: *E. coli* була рівномірно розподілена по твердому агаризованому середовищі, на яке капали 5 мкл екстракту, в відповідних розведеннях, з листя або контролів (антибіотику канаміцину та коліцину М стандартного). Компоненти дифундували з середовищем, та формували зону інгібування.

Пригнічення росту *E. coli* в рідкому середовищі: суспензію *E. coli* штаму XL1Blue змішували з рідким середовищем та додавали певну кількість екстрактів або контрольних речовин. Через день рівень інгібування визначали за прозорістю середовища вимірюючи спектрофотометром.

## 2.4 Обрахунки

Розрахунки робили в програмі Excel 2016, офісне програмне забезпечення Microsoft.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1 Перенесення плазмідних векторів 35S-Col та PVX-Col у бактеріальні клітини

Плазмідний вектор pNMD11742, був введений в бактеріальні компетентні клітини *Escherichia coli* штаму XL1Blue (з колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії, Київ, Україна) методом теплового шоку для розмноження плазмід [56].

Плазмідний вектор 35S:ColM:p19 вже був внесений в клітини *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101 (з колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії, Київ, Україна). Перед початком експериментальної роботи генетичні конструкції перевіряли на наявність гену *sta*, що кодує білок коліцин М, у колоніях *A. tumefaciens*. Присутність цільового гену була підтверджена ПЛР-аналізом. Позитивні колонії розмножувалися і в подальшому використовувалися для зараження рослин.

### 3.2 Продукція коліцину М в рослинах за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої транз'єнтної експресії генів

Для верифікації функціональної активності наявних плазмідних векторів та перевірки рівня накопичення рекомбінантного коліцину М використано метод *Agrobacterium*-опосередкованої транз'єнтної експресії. Рослини *Nicotiana benthamiana* були інфіковані бактеріальною суспензією, що несе необхідні касети експресії (рисунки 1) В якості позитивного контролю ми використовували рослини *N. benthamiana*, інфіковані бактеріальною суспензією, що несе плазмідний вектор pICH27566 (PVX-GFP), який має таку саму генетичну основу за винятком цільового гена, в даному векторі це був ген *gfp*, і накопичували рекомбінантний GFP. Накопичення GFP у прикріплених листках контролювали в неруйнівних умовах за допомогою ультрафіолетового

світла. Оскільки обидва вектори мали однакову генетичну основу ми припустили, що експресія генів та накопичення цільових білків буде відбуватися приблизно одночасно [10]. Найвищий рівень продукції GFP спостерігався через 7 днів після інокуляції, тому ми збирали рослинний матеріал з коліцином М одночасно (на 7-й день після інфільтрації), коли експресія GFP була найвищою. Далі ми визначали функціональну активність експресійних касет з геном *ста*, перевіряючи наявність коліцину в інфікованих рослинних тканинах шляхом тестування його фізіологічної активності.



Рисунок 1 – Рослина *N. benthamiana*, що продукує рекомбінантний коліцин  
М

### 3.3 Активність білку

Ми підтвердили, що обидві генетичні конструкції були активними в клітинах рослин і виробляли фізіологічно активний рекомбінантний коліцин. Ми визначили, що рівні коліцину дещо змінювалися залежно від використаних

конструкцій.

Приблизно 1,2-2,5% загального розчинного білка (ЗРБ) можна отримати за допомогою касети 35S-Col, а приблизно 1,9-3,8% ЗРБ можна отримати за допомогою касети PVX-Col. Багаторазові розведення екстрактів показали, що розведення у 200 разів, все ще зберігає фізіологічну активність і пригнічує ріст *E. coli*. Система PVX-Col виявила сильніший вплив (приблизно на 12-18%) на розвиток бактерій, аніж система 35S-Col. Екстракти з листя рослин, інфікованих двома експресійними касетами, 100- і 200-кратно розведені і додані в суспензію рідкої культури *E. coli* пригнічували ріст бактерій приблизно на 70%, в той час як контрольні білкові екстракти з неінфікованого листя не пригнічували бактеріальний ріст (рисунок 2, 9-16).

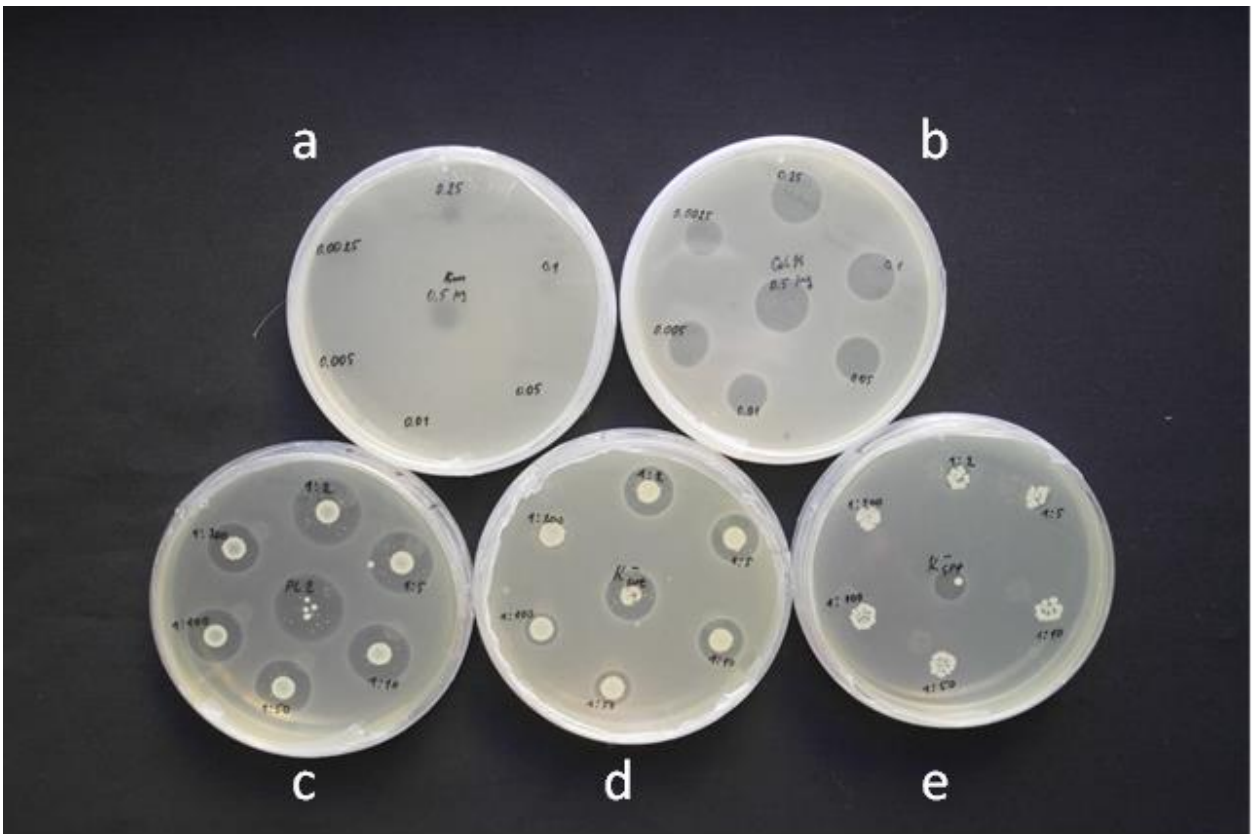


Рисунок 2 – Інгібування *E. coli* на агаризованому середовищі розведеннями різної концентрації: 0,5 мг, 0,25 мг, 0,1 мг, 0,05 мг, 0,01 мг, 0,005 мг, 0,0025мг, (а) Канаміцину, (b) коліцину М (стандартний), та розведенням: 1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, (c) екстракту з рослини, яка продукує цільовий білок коліцин, (d) екстракту з незараженої рослини (негативний контроль), (e) екстракту з рослини, що продукує GFP (Green Fluorescent Protein) (негативний контроль). На рисунку 2 (c) спостерігається, що екстракти, отримані з рослин, інфікованих експресійною касетою PVX-Col, інгібують розвиток бактерій *E. coli* штаму XL1Blue навіть при високих розведеннях (1/100 та 1/200), це демонструється світлою областю без бактерій. Позитивні контролі (канаміцин та стандартний коліцин М) виявили різні рівні інгібування *E. coli*, концентрація канаміцину була занизька для суттєвого результату, тому області інгібування були нечіткі і маленькі, на відміну від коліцину М. Негативні контролі (екстракт з незараженої рослини та екстракт з рослини, що продукує зелений флуоресцентний білок) теж виявили слабку інгібуючу дію, гіпотетично через компоненти рослинного екстракту *N. benthamiana*.

Ми підраховали, що активна концентрація бактеріального коліцину, отриманого в рослинах, була приблизно в 200 разів нижчою за концентрацію канаміцину (антибіотика), який використовується для пригнічення росту *E. coli* (рисунок 3). Тобто якщо для пригнічення росту бактерій зазвичай використовують канаміцин у концентрації 100 мг/л розчину, то при використанні коліцину достатньо буде концентрації 0,5-1 мг/л розчину. Це потенційно суттєво підвищить ефективність лікування харчових отруєнь, спричинених *E. coli*, знизить ризик їх переходу в гемолітико-уремічний синдром, скоротить тривалість інфекції, полегшить симптоми. Також використання канаміцину підвищує ризик розвитку супербактерій, а терапія коліцином зменшить рівні його використання, що в свою чергу відстрочить набуття імунітету у бактерій до цього антибіотика, або ж стане альтернативою до вже стійких до канаміцину штамів і завдяки своєму механізму дії канаміцин М потенційно затримує виникнення імунітету в штаммах *E. coli* [39]. Якщо почати попереджувати харчові отруєння *E. coli* та обробляти від бактерії продукти, що вживаються сирими і є основним джерелом захворювань, то в цьому випадку коліцин може бути ефективніший за канаміцин.

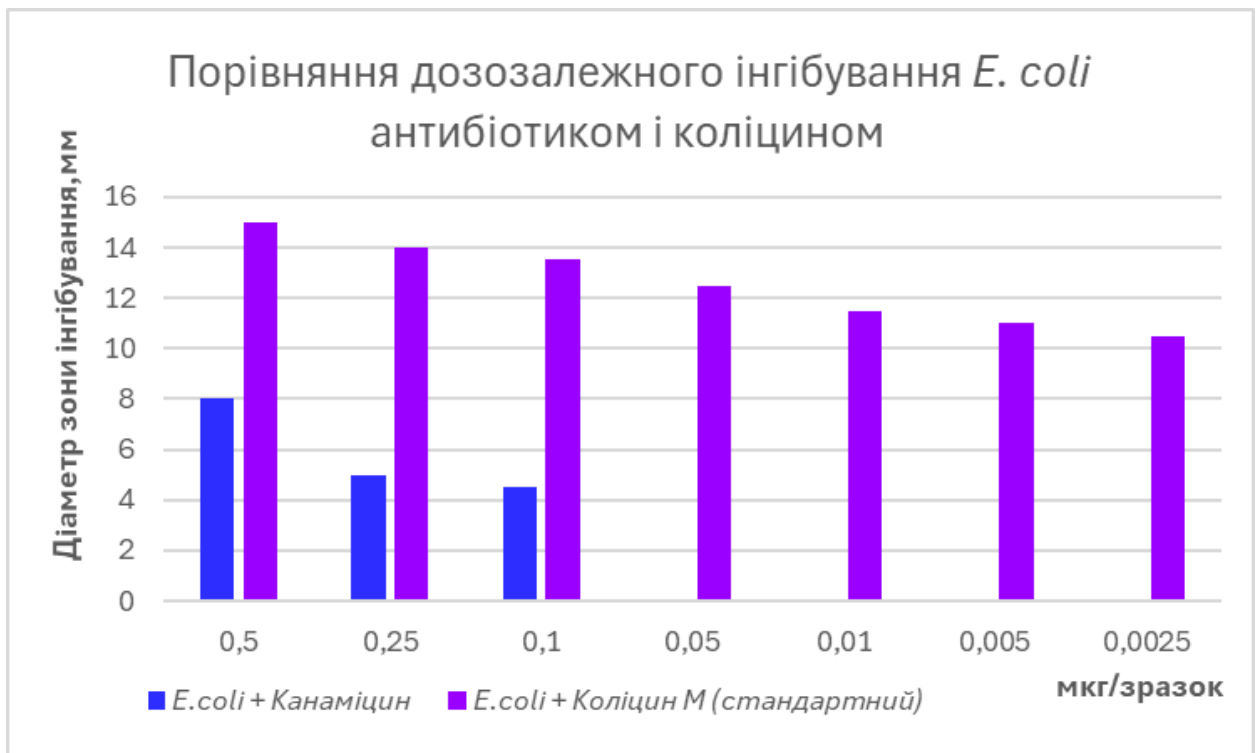


Рисунок 3 – Порівняння дозозалежного інгібування *E. coli* антибіотиком і коліцином. На графіку відображено діаметр зони інгібування (в мм) *E. coli* штаму XL1Blue антибіотиком канаміцином та коліцином М (стандартним) в різних концентраціях. Згідно цього графіку коліцин М набагато фізіологічно активніший за канаміцин, приблизно в 200 разів, так як навіть у концентрації 0,0025 мкг/мл пригнічував ріст бактерій та мав зону інгібування в 10 мм.

Активність коліцину обох касет вимірювали за пригніченням росту бактеріальних клітин штаму *Escherichia coli* XL1Blue: за допомогою вимірювання діаметра зони інгібування на агаризованих поживних середовищах для зрізів листя (рисунок 4, 5) та рослинних білкових екстрактів (рисунок 2, 6, 7), а також за допомогою вимірювання OD600 рідкої бактеріальної суспензії, вирощеної в наявності білкових екстрактів (рисунок 8). Фізіологічна активність екстрактів експресійних касет відрізнялась, рівень інгібування касети PVX-Co1 був вищий аніж касети 35S-Co1, що ми можемо побачити нижче, співставив Рисунки 4 та 5, 6 та 7. Але в рідкому середовищі активність касети 35S-Co1 була явно вищою, а суспензії були прозоріші, що можна прослідкувати на рисунках 9 та 11, 10 та 12, причини не досить

зрозумілі і потребують подальших експериментів.

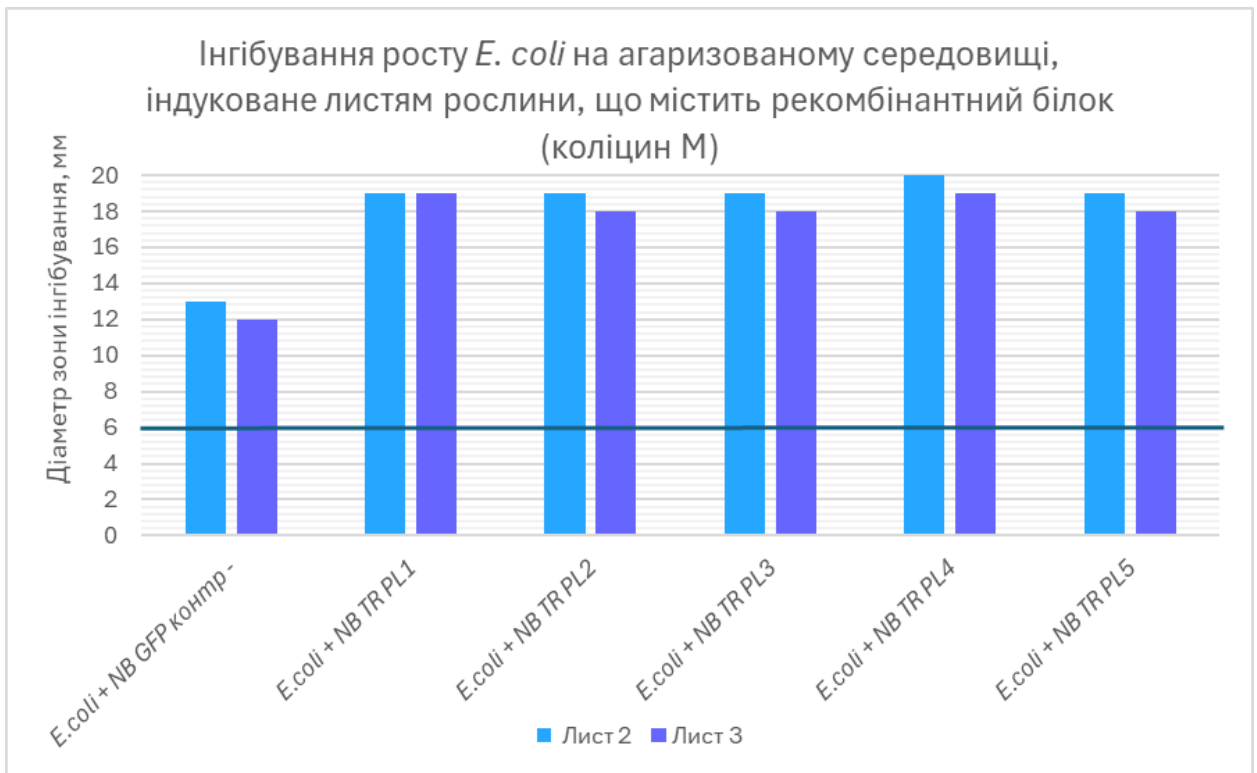


Рисунок 4 – На цьому рисунку зображений діаметр інгібування *E. coli* штаму XL1Blue на агаризованому середовищі, на яке помістили кружечки, діаметром 6 мм, вирізаних з другого-третього листів *N. benthamiana*, інфільтрованої експресійною касетою 35S-Col, та негативний контроль вирізаний з рослини інфільтрованої PVX-GFP. За цими даними, інгібування сильніше виражалось у молодших, других, листів, що свідчить про більше накопичення коліцину в новішому листі. Також прослідковується інгібування в негативному контролі, гіпотетично через компоненти рослинного соку *N. benthamiana*.

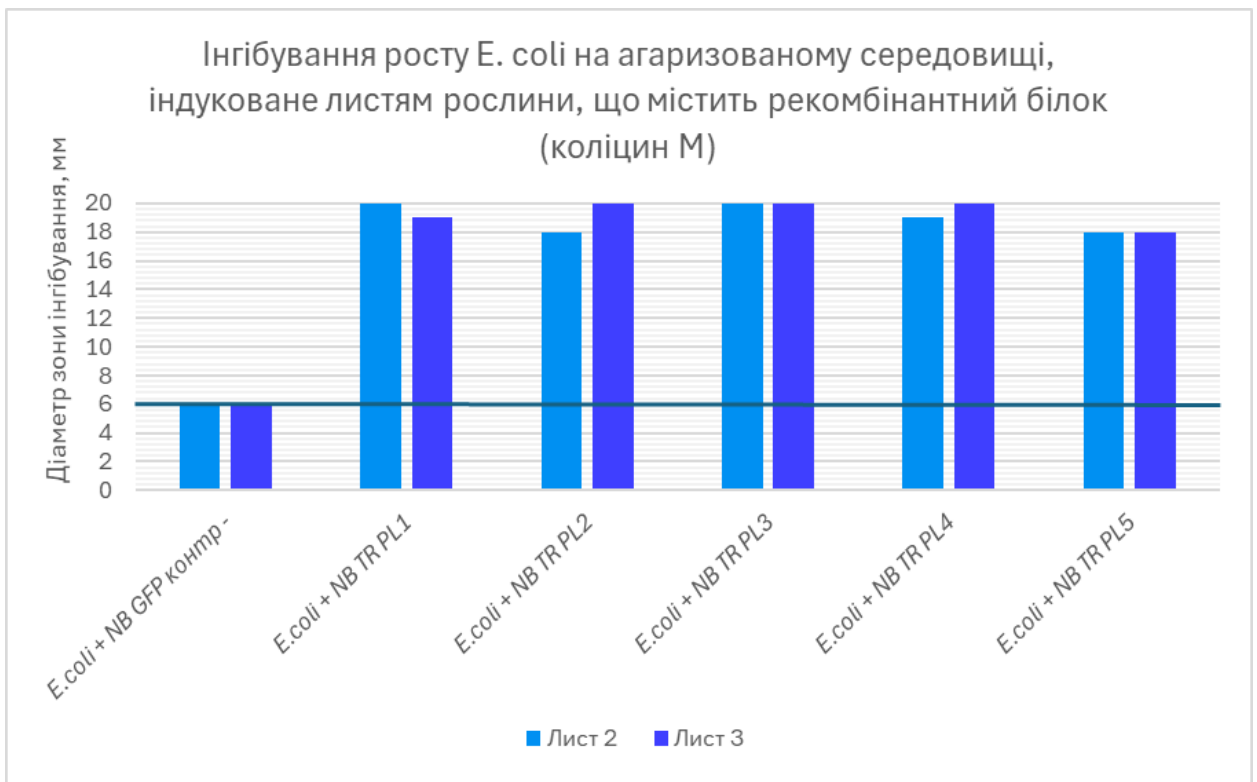


Рисунок 5 – На цьому рисунку зображений діаметр інгібування *E. coli* штаму XL1Blue на агаризованому середовищі, на яке помістили кружечки, діаметром 6 мм, вирізаних з другого-третього листів *N. benthamiana*, інфільтрованої експресійною касетою PVX-Col, та негативний контроль вирізаний з рослини інфільтрованої PVX-GFP. За цими даними, інгібування сильніше виражалось у молодших, других, листів, що свідчить про більше накопичення коліцину в новішому листі. В порівнянні з касетою 35S-Col концентрація коліцину М в листі вища. Також прослідковується інгібування в негативному контролі, гіпотетично через компоненти рослинного соку *N. benthamiana*.

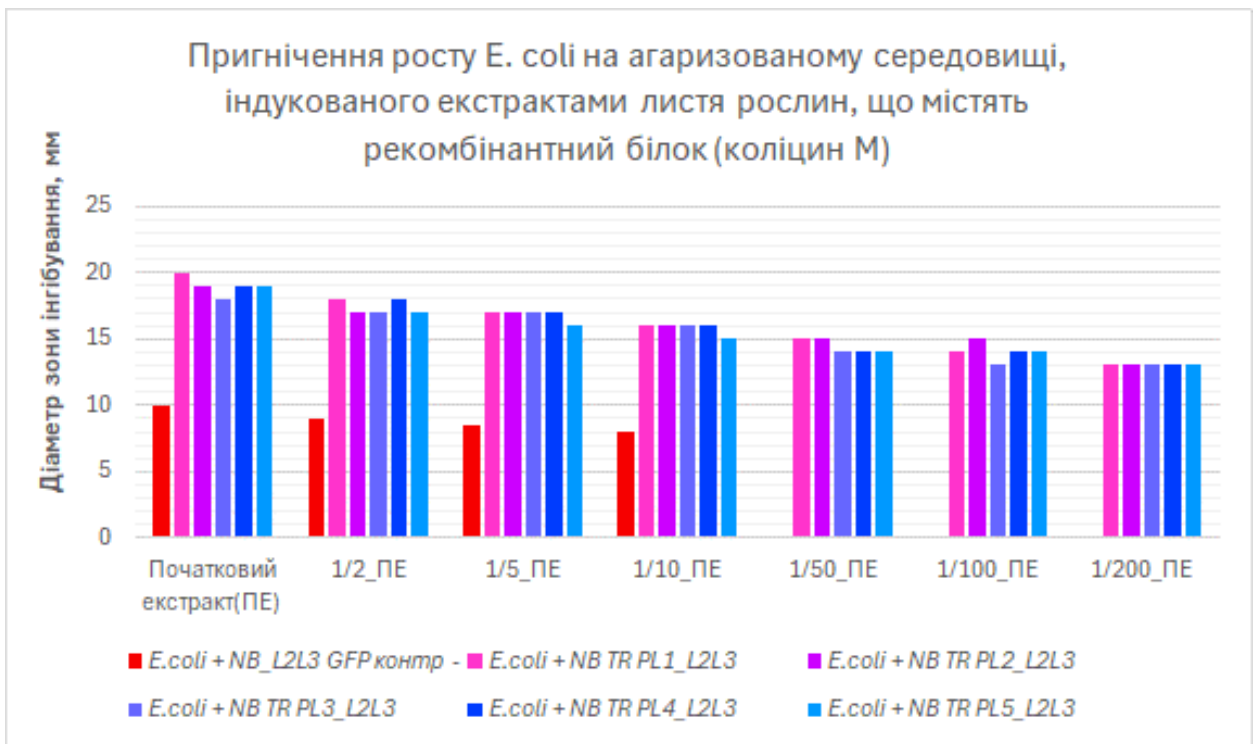


Рисунок 6 – Пригнічення росту *E. coli* на агаризованому середовищі, індукованого екстрактами листя рослин, що містять рекомбінантний білок (коліцин М), експресійна касета 35S:ColM:p19. Прослідковується активність рекомбінантного коліцину навіть в розведенні 1/100

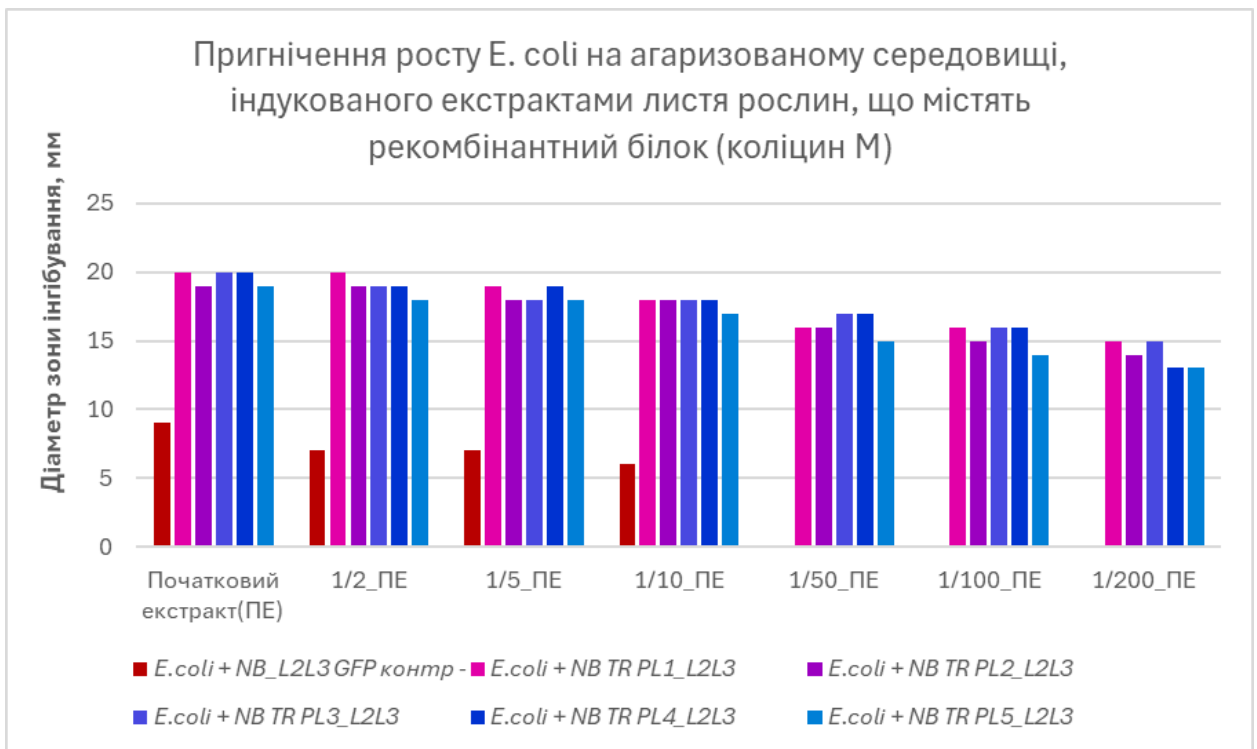


Рисунок 7 – Пригнічення росту *E. coli* на агаризованому середовищі, індукованого екстрактами листя рослин, що містять рекомбінантний білок (коліцин М), експресійна касета PVX:ColM+p19. Прослідковується активність рекомбінантного коліцину навіть в розведенні 1/200. На цьому рисунку можна прослідкувати, що касета PVX-Col мала вищу концентрацію коліцину М, за більшим діаметром інгібування *E. coli*.

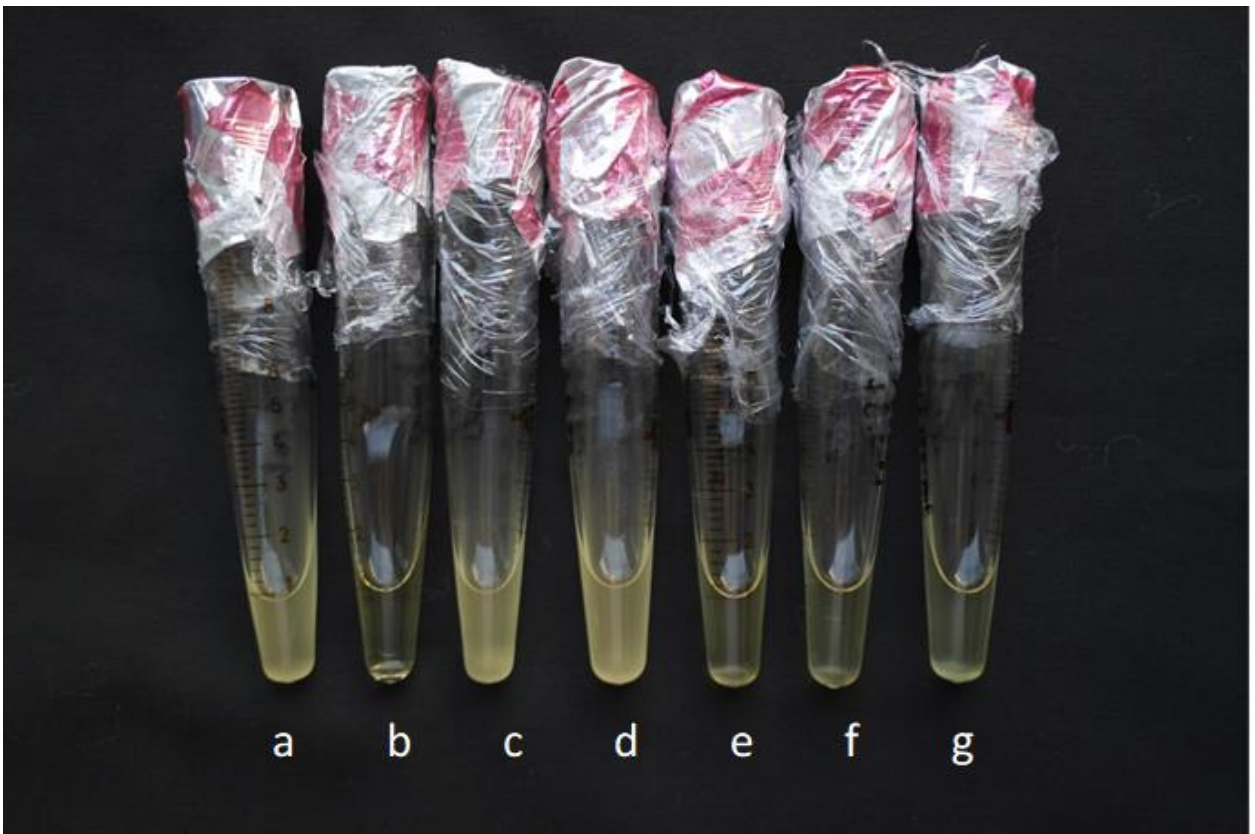


Рисунок 8 – Пробірки рідкої бактеріальної суспензії з: (а) *E. coli* (без домішок), (b) *E. coli* + Km 100 мг/L, (c) *E. coli* + екстракт з неінфікованої рослини (негативний контроль), (d) *E. coli* + екстракт з рослини, яка продукує білок GFP (негативний контроль), (e) *E. coli* + коліцин М 0.5 мг/L (стандарт), (f) *E. coli* + коліцин М 1 мг/L (стандарт), (g) *E. coli* + екстракт з рослини, яка продукує цільовий білок коліцин М (конструкція 35S:ColM:p19). На цій світліні можна побачити значну зміну в прозорості суспензії в пробірках b, e, f, g, що свідчить про інгібування розвитку *E. coli*.



Рисунок 9 – Інгібування росту *E. coli* на рідкому середовищі, індуковане 1/100 розведеними рослинними екстрактами, що містять рекомбінантний білок (коліцин М), касета 35S:ColM:p19

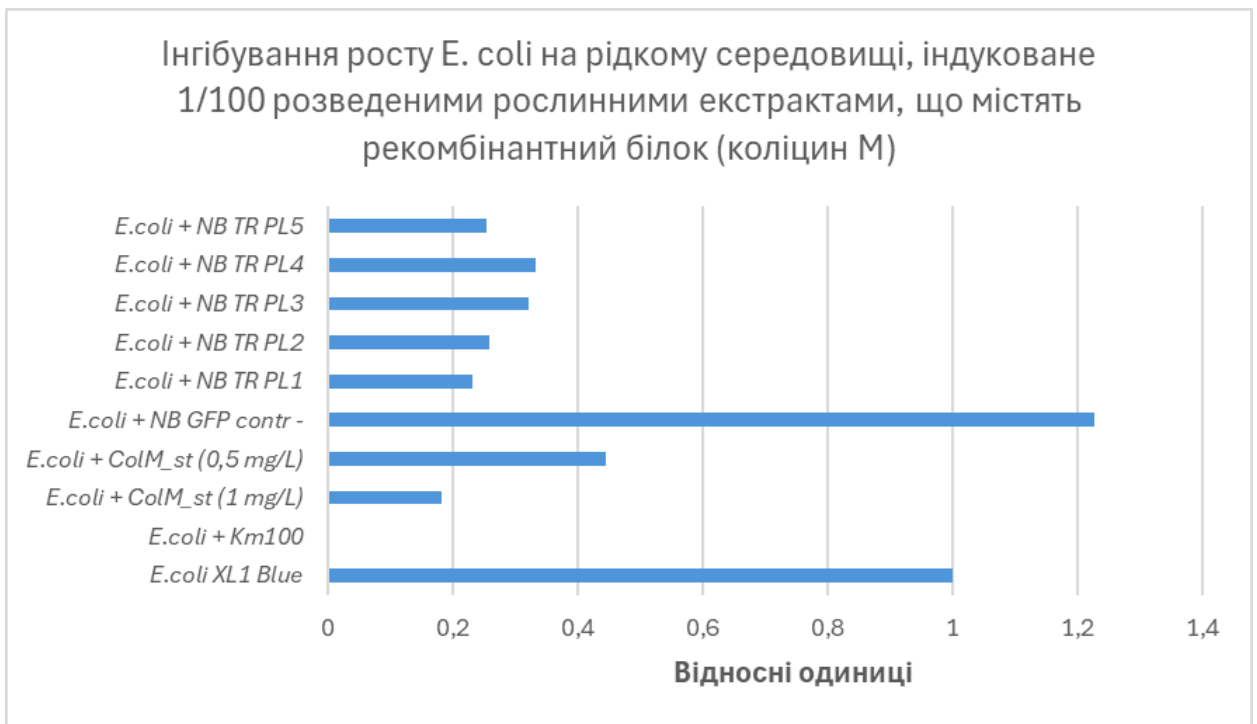


Рисунок 10 – Інгібування росту *E. coli* на рідкому середовищі, індуковане 1/100 розведеними рослинними екстрактами, що містять рекомбінантний білок (коліцин М), касета 35S:ColM:p19



Рисунок 11 – Інгібування росту *E. coli* на рідкому середовищі, індуковане 1/100 розведеними рослинними екстрактами, що містять рекомбінантний білок (коліцин М), касета PVX:ColM+p19

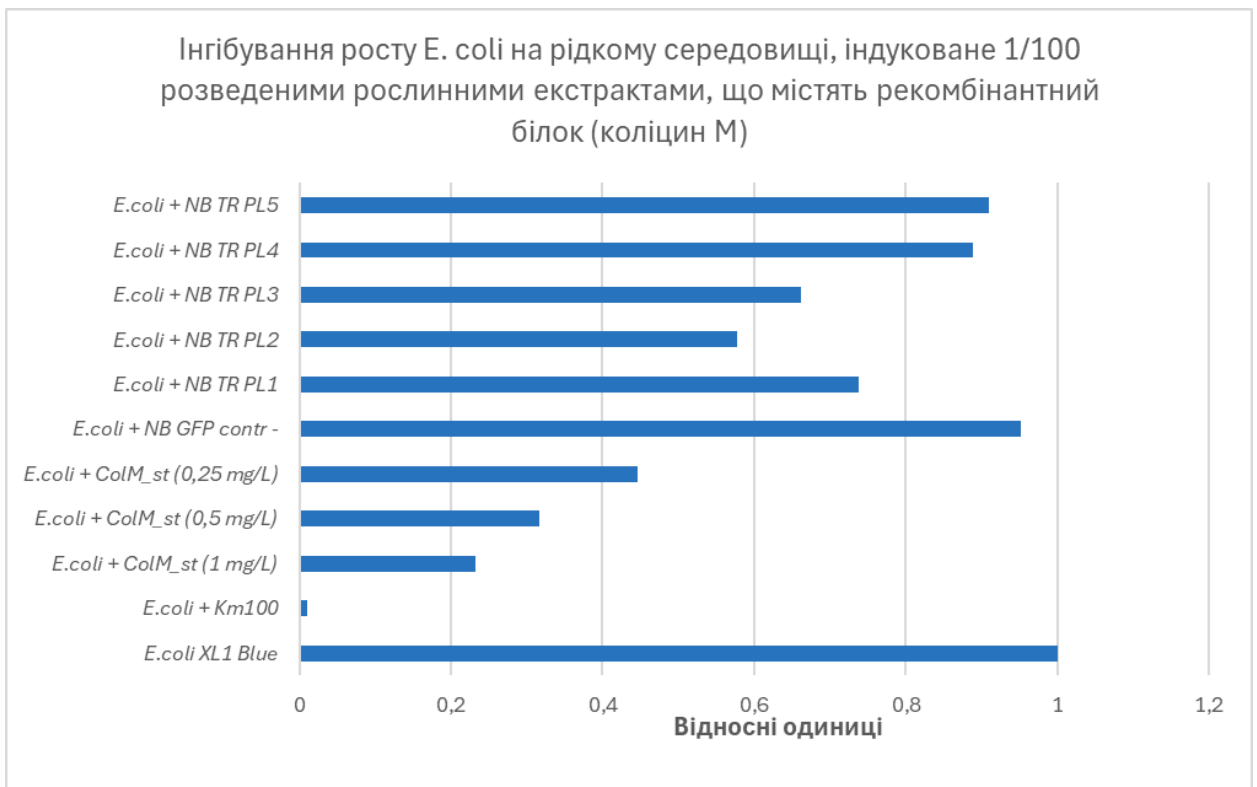


Рисунок 12 – Інгібування росту *E. coli* на рідкому середовищі, індуковане 1/100 розведеними рослинними екстрактами, що містять рекомбінантний білок (коліцин М) в відносних одиницях, касета PVX:ColM+p19

Також через тривалість дослідження ми побачили зниження активності коліцину в часі, екстракти, що зберігались в холодильній камері при 4 °С протягом тижня мали вищу фізіологічну активність (рисунок 13-14), а екстракти, що зберігались протягом 2-2,5 місяців – нижчу (рисунок 15-16). Що вказує на необхідність особливих умов зберігання рекомбінантного коліцину М для збереження його ефективності.

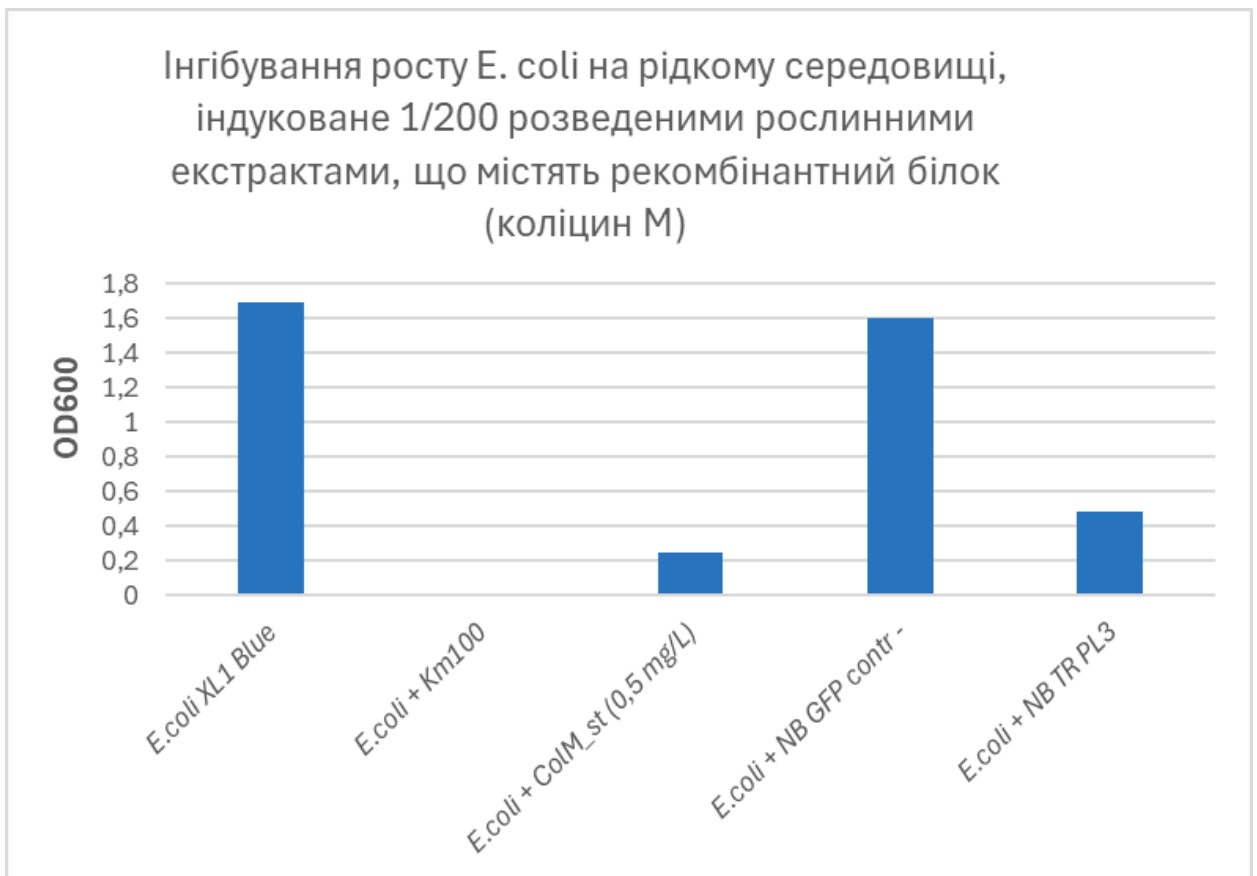


Рисунок 13 – Інгібування росту *E. coli* на рідкому середовищі, індуковане 1/200 розведеними рослинними екстрактами, що містять рекомбінантний білок (коліцин М), що зберігались при 4 °С протягом тижня, касета PVX:ColM+p19

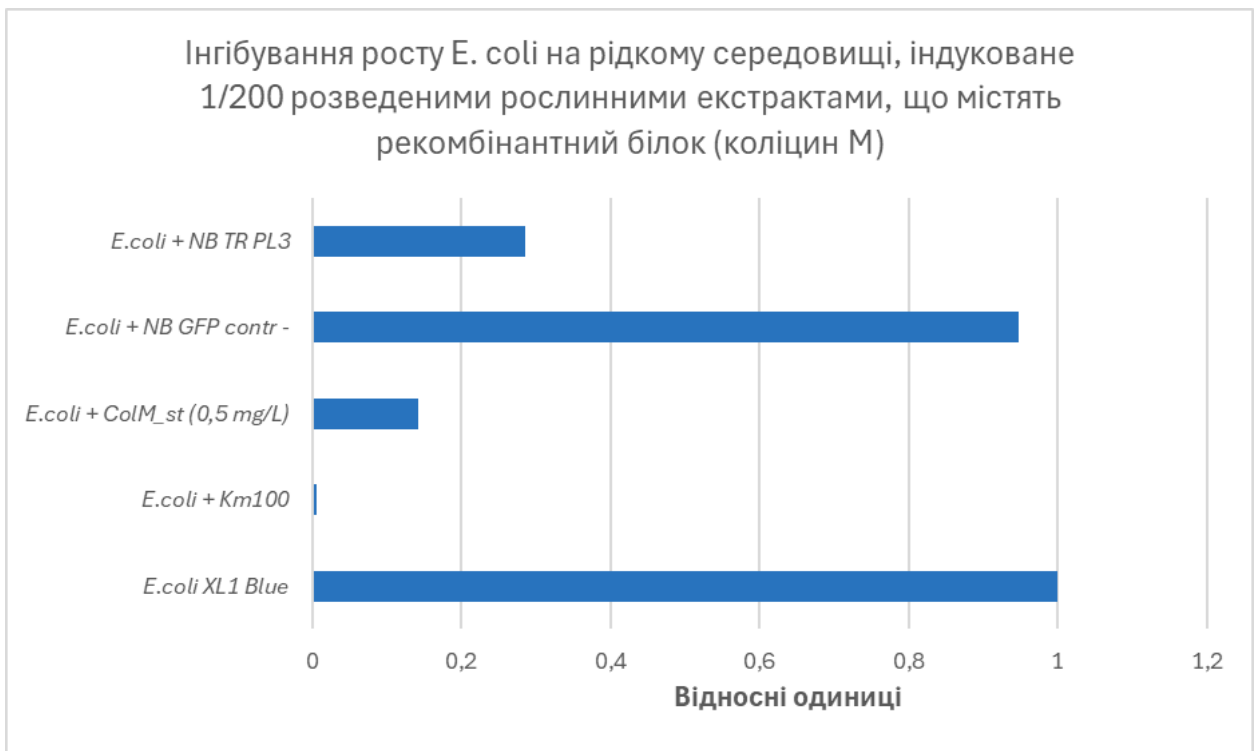


Рисунок 14 – Інгібування росту *E. coli* на рідкому середовищі, індуковане 1/200 розведеними рослинними екстрактами, що містять рекомбінантний білок (коліцин М), в відносних одиницях, що зберігались при 4 °С протягом тижня, касета PVX:ColM+p19



Рисунок 15 – Інгібування росту *E. coli* на рідкому середовищі, індуковане 1/200 розведеними рослинними екстрактами, що містять рекомбінантний білок (коліцин М), що зберігались при 4 °С протягом 2-2,5 місяців, касета PVX:ColM+p19



Рисунок 16 – Інгібування росту *E. coli* на рідкому середовищі, індуковане 1/200 розведеними рослинними екстрактами, що містять рекомбінантний білок (коліцин М), в відносних одиницях, що зберігались при 4 °С протягом 2-2,5 місяців, касета PVX:ColM+p19

Здібність рекомбінантного коліцину захищати посівні ресурси від зараження *E. coli* перевірили на насінні салату-латук (*Lactuca sativa*), методом замочування насіння в розведеному білковому екстракті з рослин, що продукують цільовий білок коліцин (рисунок 17).

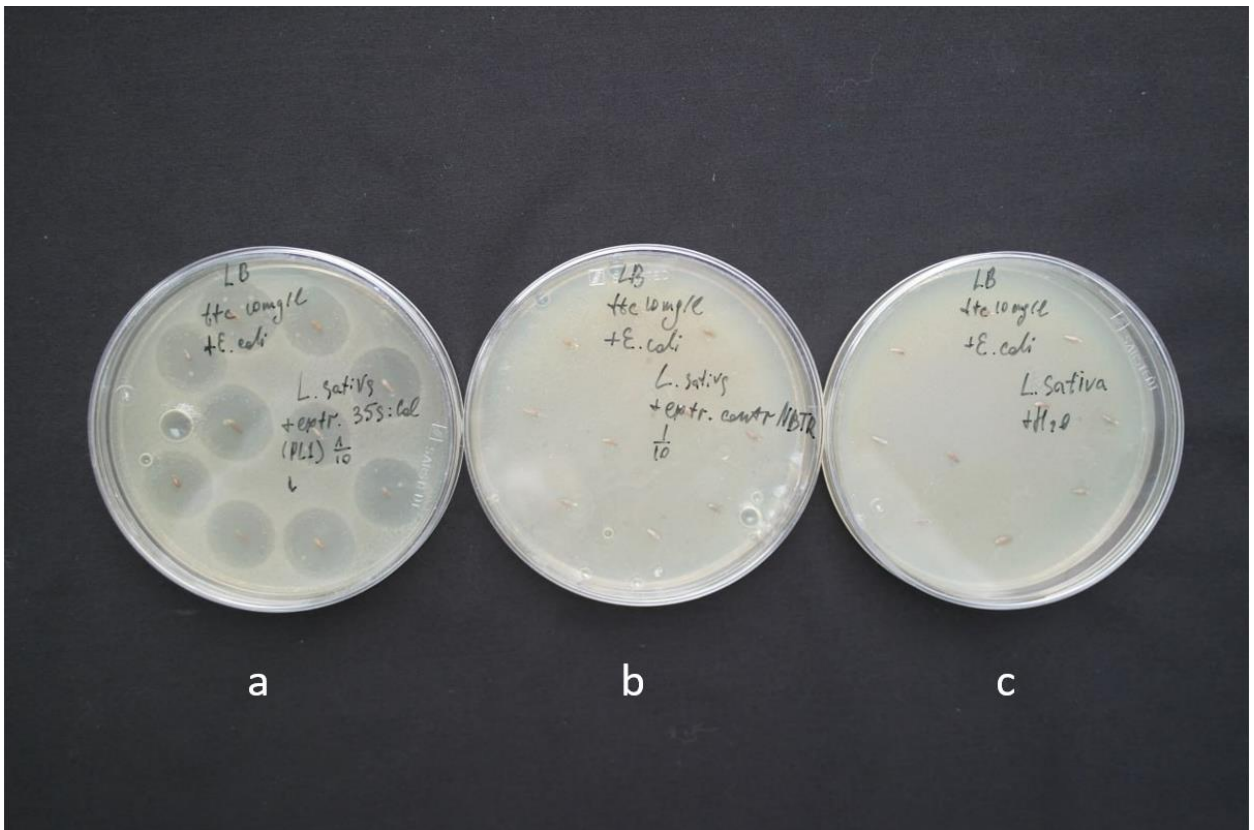


Рисунок 17 – Пригнічення росту *E. coli* навколо насіння на агаризованому середовищі, насіння замочували (а) в екстракті з листя, що містить рекомбінантний білок (коліцин М), в пропорції 1/10, касета 35S:ColM:p19 , (б) в екстракті неінфікованої рослини, в пропорції 1/10, (с) у дистилляті.

Як показано на рисунку 17 – екстракт з рекомбінантним білком суттєво захищає насіння салату-латук (*Lactuca sativa*) від кишкової палички і подальшого зараження.

### 3.4 Обговорення

Кишкова паличка, становить значний ризик для здоров'я через свою здатність викликати різні захворювання та забруднювати їжу. *E. coli* – поширена бактерія, яка мешкає в кишечнику людини. Однак певні штами можуть спричинити серйозні інфекції, особливо у вразливих груп населення, таких як люди похилого віку, маленькі діти та особи з ослабленою імунною системою. Найбільш небезпечними штамами є ті, які виробляють Шига-

токсин, які можуть призвести до гемолітично-уремічного синдрому (ГУС) і ниркової недостатності [30]. За останні роки в усьому світі відбулося кілька значних спалахів кишкової палички. Наприклад, у 2011 році великий спалах у Німеччині вразив понад 4000 людей, що призвело до 53 смертей [57]. У Сполучених Штатах Центри з контролю та профілактики захворювань повідомили про понад 2000 випадків зараження кишковою паличкою O157:H7 у 2019 році з 39 летальними випадками [58].

Щоб запобігти отруєнню кишковою паличкою, необхідно дотримуватися правил обробки та приготування їжі, але також ми можемо попередити зараження обробляючи продукти, що вживаються сирими, від цієї бактерії, або ж взагалі створювати захист, ще на етапі росту харчових рослин. Найпоширеніші зараження продуктів небезпечними штамми це фекальне зараження (інфіковані тварини заражають рослини), забруднена вода, або ж з самого початку штамми осіли на насінні рослин. Згідно інформації від Центри з контролю та профілактики захворювань у США [59], Управління з продовольства і медикаментів США [60] та дослідження опубліковані в "Journal of Food Protection" [61] вказують ряд харчових рослин, що заражаються найчастіше:

1. Листова зелень: салат, шпинат та інші листові овочі
2. Паростки: паростки люцерни, бобів та інших рослин
3. Інші: спостерігаються рідші випадки зараження капусти та огірків

Наше дослідження пропонує обробляти насіння харчових рослин, і формувати захист від *E. coli*. Бактеріоцини є ефективними ліками проти *E. coli*, та можуть націлюватись на конкретні штамми *E. coli*, знижуючи ризик стійкості до антибіотиків, що і так дуже сильно підвищується використанням антибіотиків в сільському господарстві.

В експерименті з насінням Салату-латук (*Lactuca sativa*) ми показали, що рекомбінантний коліцин М формує зону інгібування *E. coli*, що вказує на захист від зараження насіння салату, що потенційно попереджає подальше зараження, якщо не буде інших джерел збудника.

Джерелом рекомбінантного коліцину М ми обрали *N. benthamiana*, як біореактор та потенційний рентабельний метод виробництва рекомбінантних білків. Транз'єтна експресія касет 35S-Col та PVX-Col показала різні рівні продукції коліцину М, а отже компоненти однієї з касет краще взаємодіють з клітинами модельної рослини, що вказує на певні касети експресії, що підходять під певні модельні організми, а саме вірусний вектор на основі елементів геному PVX працює ефективніше аніж проста система експресії з 35S-промотором CaMV.

## ВИСНОВКИ

1. Обидві генетичні векторні конструкції (35S-Col і PVX-Col) були ефективними для виробництва рекомбінантного коліцину в рослинах *Nicotiana benthamiana*.
2. Система PVX-Col, яка має всі відкриті рамки зчитування геному та продукує всі білки, в тому числі вірусну РНК-залежну полімеразу, вірусу картоплі Х, призвела до більш високих рівнів коліцину (1,9-3,8% загального розчинного білка) порівняно з системою 35S-Col (1,2-2,5% загального розчинного білка). Це вказує на те, що вибір експресійної касети може значно вплинути на вихід рекомбінантних білків.
3. Обидві системи експресії виробляли фізіологічно активний коліцин, який ефективно пригнічував ріст *Escherichia coli*. Система PVX-Col показала сильніше пригнічення росту бактерій (на 12-18% вище) порівняно з системою 35S-Col.
4. Екстракти коліцину, розведені до 200 разів, все ще були ефективними для пригнічення росту *E. coli*, демонструючи високу ефективність рекомбінантного білка. Екстракти з обох систем зменшили ріст бактерій приблизно на 70% у рідкій культурі при 100- і 200-кратному розведенні.
5. Активна концентрація коліцину, отриманого в рослинах, необхідна для пригнічення росту *E. coli*, була приблизно в 200 разів нижчою, ніж у канаміцину, широко використовуваного антибіотика. Це свідчить про те, що коліцин, отриманий в рослинах, є дуже потужним.
6. Коліцин М виявляв нестабільність при зберіганні при +4°C протягом двох місяців, що призводило до значного зниження його активності. Це підкреслює необхідність спеціальних умов зберігання для збереження ефективності протеїну.

7. Рослинні системи можуть бути економічно вигідними та ефективними платформами для виробництва рекомбінантних білків. Однак це також вказує на важливість оптимізації експресійних касет і умов зберігання для максимізації виходу та підтримки активності білка.
8. Продемонстрували активний захист листових овочів (салату-латук) від зараження *E. coli* на стадії насіння завдяки рекомбінантному коліцину M.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Armstrong, G. L., Hollingsworth, J., & Morris, J. G. (1996). Emerging Foodborne Pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a Model of Entry of a New Pathogen into the Food Supply of the Developed World. *Epidemiologic Reviews*, 18(1), 29–51. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a017914>
2. Askar, M., Faber, M. S., Frank, C., Bernard, H., Gilsdorf, A., Fruth, A., Prager, R., Höhle, M., Suess, T., Wadl, M., Krause, G., Stark, K., & Werber, D. (2011). Update on the ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O104, Germany, May 2011. *Euro Surveillance/Eurosurveillance*, 16(22). <https://doi.org/10.2807/ese.16.22.19883-en>
3. Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 6852–6857. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400149101>
4. Baró, A., Saldarelli, P., Saponari, M., Montesinos, E., & Montesinos, L. (2022). *Nicotiana benthamiana* as a model plant host for *Xylella fastidiosa*: Control of infections by transient expression and endotherapy with a bifunctional peptide. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1061463>
5. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
6. Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Virulence*, 4(5), 366–372. <https://doi.org/10.4161/viru.24642>

7. Kontra, L., Csorba, T., Tavazza, M., Lucioli, A., Tavazza, R., Moxon, S., Tisza, V., Medzihradzky, A., Turina, M., & Burgyán, J. (2016). Distinct Effects of p19 RNA Silencing Suppressor on Small RNA Mediated Pathways in Plants. *PLOS Pathogens*, 12(10), e1005935. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005935>
8. Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W. (2014). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. In *Advances in applied microbiology* (pp. 145–197). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800262-9.00003-2>
9. Bertrand, E., Castanotto, D., Zhou, C., Carbonnelle, C., Lee, N. S., Good, P., Chatterjee, S., Grange, T., Pictet, R., Kohn, D., Engelke, D., & Rossi, J. J. (1997). The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *RNA (New York, N.Y.)*, 3(1), 75–88.
10. Sindarovska, Y., & Kuchuk, M. (2024). Construction of viral-based expression vectors for high-level production of human interferon alpha 2b in plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1). <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13069-7>
11. Hilborn, E. D., Mermin, J. H., Mshar, P. A., Hadler, J. L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M. A., Farrar, J. A., Glynn, M. K., & Slutsker, L. (1999). A Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated With Consumption of Mesclun Lettuce. *Archives of Internal Medicine*, 159(15), 1758. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.15.1758>
12. Calcuttawala, F., Pal, A., Nath, P., Kar, R., Hazra, D., & Pal, R. (2021). Structural and functional insights into colicin: a new paradigm in drug discovery. *Archives of Microbiology*, 204(1). <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02689-6>
13. Jamet, A., & Nassif, X. (2015). New Players in the Toxin Field: Polymorphic Toxin Systems in Bacteria. *MBio*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.00285-15>
14. Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 450–479. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.3.450>

15. Sindarovska, Y., & Kuchuk, M. (2021b). Long-Term Potato Virus X (PVX)-Based Transient Expression of Recombinant GFP Protein in *Nicotiana benthamiana* Culture In Vitro. *Plants*, 10(10), 2187. <https://doi.org/10.3390/plants10102187>
16. Sindarovska, Y. R., Gerasymenko, I. M., Sheludko, Y. V., Olevinskaya, Z. M., Spivak, N. Y., & Kuchuk, N. V. (2010). Production of human interferon ALPHA 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Cytology and Genetics*, 44(5), 313–316. <https://doi.org/10.3103/s0095452710050099>
17. Wadl, M., Rieck, T., Nachtnebel, M., Greutelaers, B., Heiden, M. a. D., Altmann, D., Hellenbrand, W., Faber, M., Frank, C., Schweickert, B., Krause, G., Benzler, J., Eckmanns, T., & Team, C. O. B. O. T. H. S. a. L. (2011). Enhanced surveillance during a large outbreak of bloody diarrhoea and haemolytic uraemic syndrome caused by Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in Germany, May to June 2011. *Euro Surveillance/Eurosurveillance*, 16(24). <https://doi.org/10.2807/ese.16.24.19893-en>
18. Papadakis, E. D., Nicklin, S. A., Baker, A. H., & White, S. J. (2004). Promoters and Control Elements: Designing Expression Cassettes for Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 4(1), 89–113. <https://doi.org/10.2174/1566523044578077>
19. Van Den Elzen, P. J., Walters, H. H., Veltkamp, E., & Nijkamp, H. J. (1983). Molecular structure and function of the bacteriocin gene and bacteriocin protein of plasmid Clo DF13. *Nucleic Acids Research*, 11(8), 2465–2477. <https://doi.org/10.1093/nar/11.8.2465>
20. Pearce, M. C., Jenkins, C., Vali, L., Smith, A. W., Knight, H. I., Cheasty, T., Smith, H. R., Gunn, G. J., Woolhouse, M. E. J., Amyes, S. G. B., & Frankel, G. (2004). Temporal Shedding Patterns and Virulence Factors of *Escherichia coli* Serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a Cohort of Beef Calves and Their Dams. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1708–1716. <https://doi.org/10.1128/aem.70.3.1708-1716.2004>

21. Rommens, C. M., Salmeron, J. M., Baulcombe, D. C., & Staskawicz, B. J. (1995). Use of a gene expression system based on potato virus X to rapidly identify and characterize a tomato Pto homolog that controls fenthion sensitivity. *the Plant Cell*, 7(3), 249–257. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.3.249>
22. Rooney, W. M., Chai, R., Milner, J. J., & Walker, D. (2020). Bacteriocins Targeting Gram-Negative Phytopathogenic Bacteria: Plantibiotics of the Future. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575981>
23. Lindbo, J. A. (2007a). High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC Biotechnology*, 7(1), 52. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-52>
24. Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., & Burgyán, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO Journal*, 23(4), 876–884. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600096>
25. Ghequire, M. G. K., Buchanan, S. K., & De Mot, R. (2018). The ColM Family, Polymorphic Toxins Breaching the Bacterial Cell Wall. *MBio*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.02267-17>
26. Chériér, D., Patin, D., Blanot, D., Touzé, T., & Barreteau, H. (2021). The Biology of Colicin M and Its Orthologs. *Antibiotics*, 10(9), 1109. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091109>
27. Burnett, M. J. B., & Burnett, A. C. (2019). Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*, 2(2), 121–132. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10073>
28. Elzen, P. J. D., Gaastra, W., Spelt, C. E., Graaf, F. K., Veltkamp, E., & Nijkamp, H. J. J. (1980). Molecular structure of the immunity gene and immunity protein of the bacteriocinogenic plasmid Clo DF13. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4349–4364. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4349>
29. Damos, A. G., Rosenthal, S. H., & Mason, H. S. (2016). 5' and 3' Untranslated Regions Strongly Enhance Performance of Geminiviral Replicons in *Nicotiana benthamiana* Leaves. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00200>

30. *E. coli*. (2018, February 7). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
31. Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, M. J., Follin, P., Müller, L., King, L. A., Rosner, B., Buchholz, U., Stark, K., ... HUS Investigation Team (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *The New England journal of medicine*, 365(19), 1771–1780. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106483>
32. Gross, P., & Braun, V. (1996). Colicin M is inactivated during import by its immunity protein. *MFG. Molecular & General Genetics*, 251(3), 388–396. <https://doi.org/10.1007/bf02172531>
33. Lindbo, J. A. (2007b). TRBO: A High-Efficiency Tobacco Mosaic Virus RNA-Based Overexpression Vector. *Plant Physiology*, 145(4), 1232–1240. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106377>
34. Heinisch, L., Zoric, K., Krause, M., & Schmidt, H. (2019). Transcription of the Subtilase Cytotoxin Gene subAB 1 in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Is Dependent on hfq and hns. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(20). <https://doi.org/10.1128/aem.01281-19>
35. Hammami, R., Zouhir, A., Lay, C. L., Hamida, J. B., & Fliss, I. (2010). BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-22>
36. Eidenberger, L., Kogelmann, B., & Steinkellner, H. (2023). Plant-based biopharmaceutical engineering. *Nature Reviews Bioengineering*, 1(6), 426–439. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00044-6>
37. Cao, Z., & Klebba, P. E. (2002). Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. *Biochimie*, 84(5–6), 399–412. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01455-4](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01455-4)

38. Cody, S. H., Glynn, M. K., Farrar, J. A., Cairns, K. L., Griffin, P. M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A. S., Lewis, J. H., Swaminathan, B., Bryant, R. G., & Vugia, D. J. (1999). An Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection from Unpasteurized Commercial Apple Juice. *Annals of Internal Medicine*, 130(3), 202. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-130-3-199902020-00005>
39. Harkness, R. E., & Olschläger, T. (1991). The biology of colicin M. *FEMS microbiology reviews*, 8(1), 27–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04955.x>
40. Vickers, C. E., Bydder, S. F., Zhou, Y., & Nielsen, L. K. (2013). Dual gene expression cassette vectors with antibiotic selection markers for engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 96. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-96>
41. Werber, D., Behnke, S. C., Fruth, A., Merle, R., Menzler, S., Glaser, S., Kreienbrock, L., Prager, R., Tschape, H., Roggentin, P., Bockemuhl, J., & Ammon, A. (2006). Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infection in Germany--Different Risk Factors for Different Age Groups. *American Journal of Epidemiology*, 165(4), 425–434. <https://doi.org/10.1093/aje/kwk023>
42. Sindarovska, Y., & Kuchuk, M. (2021a). Long-Term Potato Virus X (PVX)-Based Transient Expression of Recombinant GFP Protein in *Nicotiana benthamiana* Culture In Vitro. *Plants*, 10(10), 2187. <https://doi.org/10.3390/plants10102187>
43. Shcherbak, N., Prochaska, H., Lystvan, K., Prokhorova, Y., Giritich, A., & Kuchuk, M. (2023). Accumulation of colicin M protein and its biological activity in transgenic lettuce and mizuna plants. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1271757>
44. Olsen, S. J. (2002). A Waterborne Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections and Hemolytic Uremic Syndrome: Implications for Rural Water Systems. *Emerging Infectious Diseases*, 8(4), 370–375. <https://doi.org/10.3201/eid0804.000218>

45. Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology*, 23(6), 718–723. <https://doi.org/10.1038/nbt1094>
46. Mader, A., Von Bronk, B., Ewald, B., Kesel, S., Schnetz, K., Frey, E., & Opitz, M. (2015). Amount of Colicin Release in *Escherichia coli* Is Regulated by Lysis Gene Expression of the Colicin E2 Operon. *PLoS One*, 10(3), e0119124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119124>
47. Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 6852–6857. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400149101>
48. Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, E., Lacomme, C., & Burgyán, J. (2005). Plant Virus-Derived Small Interfering RNAs Originate Predominantly from Highly Structured Single-Stranded Viral RNAs. *Journal of Virology*, 79(12), 7812–7818. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.12.7812-7818.2005>
49. Duffy, G. (2003). Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 94–103. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x>
50. Oporto, B., Ocejó, M., Alkorta, M., Marimón, J. M., Montes, M., & Hurtado, A. (2019). Zoonotic approach to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: integrated analysis of virulence and antimicrobial resistance in ruminants and humans. *Epidemiology and Infection*, 147. <https://doi.org/10.1017/s0950268819000566>
51. Sheludko, Y., Sindarovska, Y., Gerasymenko, I., Bannikova, M., & Kuchuk, N. (2006). Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(3), 608–614. <https://doi.org/10.1002/bit.21075>
52. Willshaw, G., Thirlwell, J., Jones, A., Parry, S., Salmon, R., & Hickey, M. (1994). Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked

- to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Letters in Applied Microbiology*, 19(5), 304–307. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1994.tb00461.x>
53. Powell, S. K., Rivera-Soto, R., & Gray, S. J. (2015). Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy. Carolina Digital Repository (University of North Carolina at Chapel Hill). <https://doi.org/10.17615/2x9m-k248>
54. Sindarovska, Y., & Kuchuk, M. (2023). Viral-based expression cassettes ensure high level production of recombinant green fluorescent protein (GFP) in sweet basil (*Ocimum basilicum*) plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 154(1), 121–130. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02516-4>
55. Zheng, L., Yang, J., Chen, Y., Ding, L., Wei, J., & Wang, H. (2021). An improved and efficient method of *Agrobacterium syringe* infiltration for transient transformation and its application in the elucidation of gene function in poplar. *BMC Plant Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02833-w>
56. Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments*, 6. <https://doi.org/10.3791/253>
57. King, L. A., Nogareda, F., Weill, F. X., Mariani-Kurkdjian, P., Loukiadis, E., Gault, G., Jourdan-DaSilva, N., Bingen, E., Mace, M., Thevenot, D., Ong, N., Castor, C., Noel, H., Van Cauteren, D., Charron, M., Vaillant, V., Aldabe, B., Goulet, V., Delmas, G., . . . De Valk, H. (2012). Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Associated With Organic Fenugreek Sprouts, France, June 2011. *Clinical Infectious Diseases/Clinical Infectious Diseases* (Online. University of Chicago. Press), 54(11), 1588–1594. <https://doi.org/10.1093/cid/cis255>
58. Wang, T. Y., & Guo, X. (2020). Expression vector cassette engineering for recombinant therapeutic production in mammalian cell systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(13), 5673–5688. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10640-w>

59. Centers for Disease Control and Prevention. (n.d.). CDC.  
<https://www.cdc.gov/index.html>
60. U.S. Food and Drug Administration. (n.d.). U.S. Food And Drug Administration.  
<https://www.fda.gov/>
61. Journal of Food Protection. (n.d.). International Association for Food Protection.  
<https://www.foodprotection.org/publications/journal-of-food-protection/>