

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Зав. кафедри: професор, д.б.н. Будзанівська І. Г.

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ р.

**ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ВТМ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕТЕРОЛОГІЧНИХ БІЛКІВ У  
РОСЛИН *NICOTIANA BENTHAMIANA* ТА *NICOTIANA TABACUM***

Кваліфікаційна робота магістра  
студентки денної форми навчання

за спеціальністю біологія

Серажим Ангеліни Юліанівни

Науковий керівник від кафедри

Будзанівська І. Г.

Робота виконана на базі «Інституту клітинної біології та генетичної інженерії»

НАН України під керівництвом к.б.н. Овчаренко О.О.

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2026 р.**

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

**ВТМ** — вірус тютюнової мозаїки.

**GFP** — зелений флуоресцентний білок (*green fluorescent protein*).

**ПЛР** — полімеразна ланцюгова реакція.

**ЗТ-ПЛР** — зворотна транскрипція з подальшою полімеразною ланцюговою реакцією.

**кДНК** — комплементарна ДНК

**дНТФ** — дезоксирибонуклеозидтрифосфати

**ELISA** — *enzyme-linked immunosorbent assay*

**PBS** — фосфатно-сольовий буфер (*phosphate-buffered saline*)

**MS** — живильне середовище Мурасіге–Скуга (*Murashige and Skoog medium*)

**LB** — живильне середовище Лурія–Бертрані (*Luria–Bertani medium*)

**PTGS** — посттранскрипційний сайленсинг генів (*post-transcriptional gene silencing*)

**RNAi** — РНК-інтерференція (*RNA interference*)

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	2
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1 Особливості будови та фізіології <i>Nicotiana benthamiana</i> та <i>Nicotiana tabacum</i> як модельних об'єктів	7
1.2 Вплив вірусів на експресію гетерологічних генів у рослинах	10
1.3 Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ): структура, життєвий цикл та взаємодія з рослиною	12
1.4 Взаємодія ВТМ з рослиною та вплив на білковий метаболізм	15
1.5 Фактори, що обмежують накопичення рекомбінантних білків у <i>N. benthamiana</i> та <i>N. tabacum</i>	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	21
2.1 Асептична обробка рослинного матеріалу	21
2.2 Культивування рослинного матеріалу <i>in vitro</i>	22
2.3 Підготовка бактеріальної культури	24
2.4 Агробактеріальна трансформація тютюнів	26
2.5 Підготовка та акліматизація рослин до тепличного середовища	27
2.6 Виділення вірусу тютюнової мозаїки	28
2.7 Метод інфікування рослин <i>Nicotiana benthamiana</i> та <i>Nicotiana tabacum</i> вірусом тютюнової мозаїки	30
2.8 Визначення інтенсивності флуоресценції GFP	31
2.9 Визначення загальної концентрації білка у рослинах	32
2.10 Метод імуноферментного аналізу	34
2.11 Методика виділення РНК	37
2.12 Методика проведення ЗТ-ПЛР	38
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ	40
3.1 Візуальна оцінка симптомів інфікування рослин вірусом ВТМ	40

3.2 Оцінка накопичення ВТМ у рослинах <i>Nicotiana benthamiana</i> методом непрямого ІФА	43
3.3 Детекція вірусної РНК ВТМ у рослинах методом ЗТ-ПЛР	46
3.4 Аналіз флуоресценції GFP у трансгенних рослинах до та після інфікування ВТМ	49
ВИСНОВКИ	53
СПИСКИ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	54

## ВСТУП

Сучасні біотехнології рослин відкривають широкі можливості для отримання рекомбінантних білків фармацевтичного, діагностичного та аграрного призначення. Рослинні експресійні системи розглядаються як перспективна альтернатива традиційним мікробним і тваринним платформам завдяки біобезпечності, економічній ефективності, відносній простоті масштабування та здатності забезпечувати еукаріотичні посттрансляційні модифікації білків. Особливого значення набувають системи, що базуються на використанні вірусних векторів, оскільки вони дають змогу швидко отримувати високий рівень експресії цільових генів у рослинних тканинах [1].

Одним із найкраще вивчених рослинних вірусів є вірус тютюнової мозаїки (ВТМ), який широко використовують як модельний об'єкт у вірусології та молекулярній біології рослин. Завдяки простій організації геному, високій стабільності та здатності до системного поширення в тканинах рослини ВТМ є зручним інструментом для дослідження взаємодії «вірус–рослина» та регуляції експресії генів в умовах вірусного інфікування. Водночас інфекція ВТМ супроводжується суттєвими змінами клітинного метаболізму, функціонування трансляційного апарату, рівня стресових реакцій і фізіологічного стану рослини загалом, що потенційно може впливати на синтез і накопичення гетерологічних білків [16].

У дослідженнях рослинної біотехнології та молекулярної вірусології важливе місце посідають рослини *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*. *N. benthamiana* характеризується високою сприйнятливістю до агробактеріальної трансформації та вірусних інфекцій, що робить її зручною моделлю для аналізу тимчасової та стабільної експресії генів. *N. tabacum*, своєю чергою, є класичним модельним об'єктом у рослинній вірусології та генетичній інженерії. Використання двох близькоспоріднених видів дає можливість порівняти особливості впливу вірусної інфекції на експресію трансгенів у різних генетичних і фізіологічних умовах [4].

Актуальність роботи полягає в необхідності з'ясування того, як вірусне інфікування впливає на рівень експресії гетерологічних білків у трансгенних рослинах. Такі дослідження є важливими як для фундаментального розуміння взаємодії між вірусом і генетично модифікованою рослиною, так і для практичного вдосконалення рослинних експресійних платформ, що використовуються для отримання рекомбінантних білків. Оцінка змін експресії трансгенного білка в умовах ВТМ-інфекції дозволяє краще зрозуміти обмеження та потенційні переваги використання рослинних систем у біотехнології [11].

Мета роботи — вивчити вплив вірусу тютюнової мозаїки на експресію гетерологічних білків у трансгенних рослинах *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*.

Завдання :

- Дослідити вплив вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) на активність гетерологічного білка.
- Порівняти рівень експресії білка у *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*.
- Визначити вплив вірусної інфекції на накопичення рекомбінантного білка.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Особливості будови та фізіології *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum* як модельного об'єкта

Рослини роду *Nicotiana* протягом тривалого часу є важливими об'єктами досліджень у галузі молекулярної біології рослин, вірусології та біотехнології. Особливу увагу серед них привертають *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*, які широко використовуються як модельні системи завдяки своїм генетичним, фізіологічним і біохімічним особливостям. Ці види активно залучаються як у фундаментальних дослідженнях, зокрема для аналізу функціонування генів, так і в прикладних напрямках, що включають отримання рекомбінантних білків, дослідження взаємодії рослин із вірусами та розробку сучасних експресійних систем [1].

*Nicotiana benthamiana* — це однорічна рослина, яка відзначається унікальним поєднанням рис, що сприяють її широкому використанню у наукових дослідженнях. Цей вид демонструє високу здатність до агробактеріальної трансформації, що дозволяє успішно переносити генетичний матеріал у рослинні клітини та досягати стабільної або транзиторної експресії бажаних генів. Однією з ключових переваг *N. benthamiana* є її здатність до швидкого росту та формування значної зелені протягом короткого періоду. Велика листкова площа дає змогу проводити агроінфільтрацію у великому масштабі, що важливо для одержання високого виходу білка [2].

Цікаво, що *N. benthamiana* має підвищену сприйнятливість до широкого кола фітопатогенів, зокрема вірусів, бактерій та грибів. Ця біологічна особливість робить її зручною моделлю для дослідження імунних реакцій рослин, вірусної реплікації, патогенезу та механізмів системного поширення

вірусних частинок. Однією з молекулярних основ такої підвищеної чутливості є мутація в гені RDR1 (RNA-dependent RNA polymerase 1), який відіграє важливу роль у механізмах РНК-інтерференції — основного захисного процесу рослин проти вірусної інфекції. У *N. benthamiana* цей механізм є частково приглушеним, що створює оптимальні умови для інтенсивної вірусної реплікації та підтримки експресії вірусних векторів у тканинах рослини [3].

У біотехнологічних дослідженнях *N. benthamiana* стала невід'ємним елементом розробки рослинних платформ для отримання моноклональних антитіл, вакцинних антигенів, ферментів та інших терапевтичних білків. Поєднання її генетичної проникності, фізіологічної пластичності та здатності до масштабованого вирощування робить цю рослину незамінним інструментом у сучасній біофармацевтичній індустрії [4].

Порівняно з *N. benthamiana*, *Nicotiana tabacum* історично є одним із першопрохідців у наукових дослідженнях рослинних вірусів і експресійних систем. *N. tabacum* — це багаторічна тютюнова культура, яка вже понад століття використовується як модель у генетиці, фізіології рослин та вірусології. Саме на основі *N. tabacum* було вперше ідентифіковано вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) — один з найкраще вивчених рослинних вірусів, що слугує базою для створення вірусних векторів у біотехнології [4].

Фізіологічні характеристики *N. tabacum* суттєво впливають на її використання як модельної системи. Ця рослина має добре розвинену провідну систему, велику листову масу та високу біомасу, що забезпечує потенційно високий рівень накопичення рекомбінантних білків у стабільних трансгенних лініях. На відміну від *N. benthamiana*, *N. tabacum* часто демонструє більш ефективні механізми противірусного захисту, що дозволяє вивчати не лише експресію білків за умов вірусної інфекції, але й особливості імунної відповіді рослини на поєднання генетичних змін і вірусного навантаження [5].

Генетична стабільність *N. tabacum* робить її цінною моделлю для довгострокових досліджень, у тому числі для створення й підтримки стабільних трансгенних ліній. Ці лінії широко застосовуються для виробництва біопрепаратів, включаючи вакцинні антигени та терапевтичні білки, з можливістю збереження генетичної інформації протягом багатьох поколінь рослин [5].

Однією з важливих переваг використання *N. tabacum* є її добре вивчений геном, велика кількість генетичних та молекулярних ресурсів, а також адаптація до вирощування в різних умовах. Ці характеристики дозволяють дослідникам проводити детальний аналіз як на рівні окремих генів, так і на рівні цілісних генетичних мереж, що бере участь у регуляції експресії білків та взаємодії з вірусами [6].

Поєднання *N. benthamiana* та *N. tabacum* у межах одного дослідження відкриває нові можливості для порівняльного аналізу фізіологічних відповідей рослин на вірусну інфекцію, а також для оцінювання потенційних переваг і обмежень різних модельних систем у рослинній біотехнології. Порівняння цих двох видів дозволяє глибше зрозуміти, як специфічні генетичні та клітинні механізми впливають на ефективність експресії гетерологічних білків, що має ключове значення для окремих галузей — від фундаментальної науки до прикладних біофармацевтичних технологій [6].

Завдяки своїм унікальним властивостям, *N. benthamiana* і *N. tabacum* залишаються основними моделями у сучасних дослідженнях, де важливо розкрити молекулярні механізми регуляції експресії, визначити ефекти вірусної інфекції на білковий синтез та розробити оптимальні системи для виробництва біологічно активних білків [6].

## 1.2 Вплив вірусів на експресію гетерологічних генів в рослинах

Вірусна інфекція є одним із важливих чинників, що можуть впливати на стабільну експресію гетерологічних генів у рослинах, оскільки віруси активно

втручаються в молекулярні процеси клітини-господаря. Під час інфекції відбувається суттєва перебудова клітинного метаболізму, що супроводжується змінами транскрипції, трансляції та стабільності РНК. Унаслідок цього можуть змінюватися не лише рівні експресії ендогенних генів, а й стабільність накопичення транскриптів і білкових продуктів, синтезованих на основі інтегрованих у геном рослини гетерологічних конструкцій [7].

Вплив вірусної інфекції на стабільну експресію гетерологічних генів має переважно негативний характер. Віруси можуть спричиняти глибокі зміни у функціонуванні клітини, що позначається на сталій роботі трансгенних конструкцій. Зокрема, в умовах інфекції можливі порушення рівноваги між транскрипцією, трансляцією та деградацією РНК, унаслідок чого змінюється рівень накопичення рекомбінантного білка. Таким чином, навіть за наявності інтегрованого в геном рослини трансгену вірусна інфекція може впливати на стабільність його експресії на різних етапах реалізації генетичної інформації [8].

Крім того, вірусна інфекція супроводжується загальними фізіологічними змінами в рослині, зокрема пригніченням росту, порушенням фотосинтезу та змінами білкового метаболізму. Це зумовлює перерозподіл клітинних ресурсів на користь реплікації вірусу, що може обмежувати синтез гетерологічних білків або змінювати їх накопичення в тканинах рослини. У такому разі йдеться не лише про зміну абсолютного рівня експресії, а й про порушення її стабільності, тобто здатності трансгенної рослини підтримувати відносно постійний рівень синтезу цільового продукту в умовах біотичного стресу [10].

Водночас інфікування рослин дикими, тобто неекторними, вірусами не завжди однаковою мірою впливає на стабільну експресію чужорідних генів, а його наслідки залежать від конкретної системи «вірус – рослина – трансген». Зокрема, у трансгенному тютюні, що експресував терапевтичний білок PSA-IgG FcK, зараження диким вірусом тютюнової мозаїки викликало типові

симптоми інфекції, однак не спричинило статистично значущих змін рівня експресії цільового білка. Крім того, кількість очищеного білка та його чистота були подібними в інфікованих і неінфікованих рослин, а вірусні частинки не виявлялися в очищених препаратах. Це свідчить про те, що в окремих системах навіть за наявності вираженого інфекційного процесу стабільна експресія рекомбінантного продукту може зберігатися[11].

Проте результати інших досліджень демонструють, що вплив дикого вірусу може бути значно глибшим і залежить від функції трансгену та метаболічного стану рослини. Так, інфікування тютюну Potato virus X (PVX) у нетрансгенних рослин супроводжувалося активацією генів фенілпропаноїдного та флавоноїдного біосинтезу і підвищенням вмісту хлорогенової, *p*-кумарової, бензойної кислот, а також рутину, кверцетину й кемпферолу. Натомість у AtPAP1-трансгенних рослин PVX знижував експресію самого AtPAP1 і пов'язаних із ним генів вторинного метаболізму, а також зменшував вміст фенольних сполук і антоціанів; водночас підвищувалися рівні амінокислот і проміжних продуктів ТСА-циклу. Такі дані свідчать, що вірусна інфекція може порушувати стабільність функціонування трансгену, особливо якщо він залучений у регуляцію метаболічних процесів[12].

Отже, вірусна інфекція має складний і багатофакторний вплив на стабільну експресію гетерологічних генів у рослинах, який визначається балансом між стимулювальними ефектами, пов'язаними з пригніченням захисних механізмів клітини, та негативними наслідками, такими як генетична нестабільність вставок і порушення клітинного метаболізму. Водночас результати досліджень із дикими вірусами свідчать, що їх вплив не є універсальним: у системі TMV/PSA-IgG FcK істотного зниження накопичення рекомбінантного білка не спостерігали, тоді як у системі PVX/AtPAP1 вірус суттєво перебудовував експресію трансгену та вторинний метаболізм рослини. Це обумовлює необхідність детального дослідження впливу вірусів на накопичення рекомбінантних білків у трансгенних рослинах з урахуванням

типу вірусу, природи трансгену та фізіологічного стану рослини-господаря[12].

### **1.3 Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ): структура, життєвий цикл, особливості взаємодії з рослиною**

Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) є одним із найбільш вивчених фітовірусів у світі, який справедливо вважається класичною моделлю в молекулярній вірусології рослин. Історія досліджень ВТМ налічує понад сто років — саме цей вірус у 1892 році був першим, що довів існування неклітинних збудників [13].

ВТМ належить до роду *Tobamovirus*, родини *Virgaviridae*. Це позитивна РНК-вірусна частинка, яка складається з онониткового (+)РНК-геному. Геном кодує чотири основні білки: два білки репліказного комплексу (126 кДа і 183 кДа), білок руху (movement protein, MP) масою 30 кДа, а також білок капсиду (coat protein, CP) масою 17,5 кДа. Саме поєднання компактного генома та чіткої функціональної організації робить ВТМ зручним об'єктом для молекулярного конструювання [13].

Віріон ВТМ має характерну паличкоподібну форму, довжиною близько 300 нм і діаметром 18 нм. Його структура є надзвичайно стабільною: вірус зберігає інфекційність навіть після багаторічного зберігання в сухому листі. Стабільність частинки забезпечується щільною спіраллю з 2130 однакових білкових субодиниць, які формують трубку навколо РНК. Завдяки цьому ВТМ є ідеальним вектором для доставки генетичного матеріалу у рослинні клітини, оскільки не втрачає активності при різних умовах зберігання та обробки. [13]

Життєвий цикл ВТМ починається з проникнення в клітину-хазяїна через механічні пошкодження на поверхні рослинного епідермісу. Після цього вірусна РНК вивільняється в цитоплазму і безпосередньо функціонує як матриця для трансляції вірусних білків. Репліказні білки 126 кДа і 183 кДа

першими синтезуються з вірусного геному і беруть участь у формуванні реплікативного комплексу на мембранах ендоплазматичного ретикулу. Далі відбувається синтез повногеномної та субгеномної РНК, які забезпечують продукцію білків руху і капсиду [6].

Ключову роль у міжклітинному поширенні ВТМ відіграє білок руху. Він здатний взаємодіяти з плазмодесмами — тонкими каналами між клітинами рослинної тканини — та розширювати їхній розмірний еквівалент, дозволяючи вірусній РНК проходити з однієї клітини до іншої. Після досягнення судинних тканин, насамперед флоєми, ВТМ починає поширюватися системно, уражаючи всю рослину. Завдяки такій ефективності вірус здатен інфікувати більшість тканин за кілька діб, що є однією з причин його агресивності [18].

ВТМ спричиняє типові симптоми вірусної інфекції: мозаїчне забарвлення листя, некрози, деформації, зниження росту та втрату продуктивності. У модельної рослини *Nicotiana benthamiana*, яка надзвичайно сприйнятлива до цього вірусу, також фіксуються глибокі порушення фізіології — зміни експресії генів, активація захисних механізмів, накопичення вторинних метаболітів. Це робить ВТМ ідеальним об'єктом для вивчення молекулярних аспектів взаємодії вірусу та рослини [13].

Окрім патогенності, ВТМ знайшов широке застосування у біотехнологіях. Його використовують як вірусний вектор для експресії рекомбінантних білків у рослинах, зокрема для синтезу вакцин, антитіл, ферментів, індикаторних білків. Наприклад, на основі ВТМ було розроблено кілька ефективних систем експресії, таких як TRVO, що забезпечують високий рівень продукції цільового білка у листках *N. benthamiana*. Ці системи активно застосовуються в молекулярному фармінгу — перспективному напрямі виробництва біофармацевтичних препаратів [21].

Стійкість ВТМ до зовнішнього впливу і легкість механічної передачі є водночас перевагою і загрозою. Вірус легко передається через інструменти, руки, забруднене насіння та рослинні рештки. Тому боротьба з ВТМ у

сільському господарстві передбачає впровадження суворих фітосанітарних норм, використання стерильних інструментів, знищення заражених рослин та впровадження генетично модифікованих ліній з підвищеною стійкістю [21].

Останні підходи в захисті рослин передбачають використання методів РНК-інтерференції (RNAi) — механізму клітинного захисту, який дозволяє цілеспрямовано пригнічувати експресію вірусної РНК. Крім того, генетична інженерія дозволяє створювати рослини, що експресують антивірусні білки або домінантно-негативні форми білків ВТМ, які блокують життєвий цикл вірусу. Такі підходи вже демонструють високу ефективність у лабораторних умовах і поступово впроваджуються в аграрну практику [21].

ВТМ не лише створює загрозу для врожаю, але й відкриває нові горизонти в рослинній біотехнології. Його глибоке вивчення дозволяє не тільки боротися з вірусними захворюваннями, а й використовувати вірус як інструмент у науці та медицині. Завдяки ВТМ ми маємо потужну модель для дослідження основ вірусної інфекції, а також перспективну платформу для синтезу біологічно активних речовин [22].

## 1.4 Взаємодія ВТМ з рослиною та вплив на білковий метаболізм

Вірус тютюнової мозаїки є типовим прикладом фітовірусу, який тісно інтегрується в клітинні процеси рослини-господаря. Після проникнення в клітину його генетичний матеріал швидко залучає апарат хазяїна до синтезу вірусних компонентів, а подальший розвиток інфекції супроводжується використанням мембранних структур, транспортних систем і метаболічних ресурсів клітини. Унаслідок цього вірусна інфекція не обмежується лише накопиченням вірусних частинок, а викликає глибоку перебудову фізіологічного стану рослини. Саме тому ВТМ розглядають не тільки як збудника хвороби, а й як зручну модель для вивчення взаємодії рослин і вірусів на клітинному та молекулярному рівнях [21].

У процесі інфекції ВТМ змінює нормальний перебіг багатьох клітинних функцій. Для ефективного розмноження і поширення вірус використовує ресурси рослини, які в нормі спрямовуються на ріст, фотосинтез, синтез власних білків і підтримання клітинного гомеостазу. Паралельно відбувається активація захисних реакцій рослини, однак вірус здатний модулювати ці відповіді, послаблюючи частину противірусних механізмів і змінюючи сигнальні шляхи, пов'язані зі стресом та імунітетом. Унаслідок такої взаємодії формується складний баланс між захисною реакцією хазяїна і пристосувальними механізмами вірусу, що визначає інтенсивність розвитку інфекції та ступінь ушкодження тканин [23].

Особливо помітно ВТМ впливає на білковий метаболізм рослини. За даними протеомних досліджень, інфекція супроводжується змінами вмісту великої кількості клітинних білків, які беруть участь у фотосинтезі, енергетичному обміні, трансляції, процесингу новосинтезованих білків і реакціях на стрес. Це свідчить про те, що вірус не просто використовує вже наявний синтетичний апарат клітини, а фактично спричиняє його функціональне переналаштування. У заражених рослин часто спостерігається

порушення нормального білкового балансу: частина білків накопичується меншою мірою через пригнічення звичайних метаболічних процесів, тоді як інші, навпаки, посилено синтезуються як елементи стресової або захисної відповіді. Такі зміни є однією з причин зниження фізіологічної активності листка, ослаблення фотосинтетичних процесів і загального пригнічення росту інфікованих рослин [24, 25].

Важливо, що вплив ВТМ на білковий обмін не обмежується лише зміною рівня синтезу білків. Сучасні дослідження показали, що під час інфекції істотно змінюється і посттрансляційна регуляція білків, зокрема процеси, які визначають їхню активність, стабільність, локалізацію та участь у сигнальних реакціях. Фосфопротеомний аналіз засвідчив, що ранні етапи взаємодії ВТМ з рослиною супроводжуються значними змінами у фосфорилуванні великої кількості клітинних білків, а також вірусна інфекція пов'язана з масштабною перебудовою інших посттрансляційних модифікацій. Отже, ВТМ впливає не тільки на те, які білки синтезуються в клітині, а й на те, у якому функціональному стані вони перебувають [26].

Для досліджень, пов'язаних з експресією гетерологічних білків у рослинах, ці зміни мають особливе значення. З одного боку, вірусне інфікування може тимчасово активувати процеси, що сприяють накопиченню чужорідного білка. З іншого боку, ВТМ створює конкуренцію за ресурси клітини, порушує енергетичний баланс, змінює роботу синтетичного апарату та може впливати на стабільність уже синтезованих білків. Тому в експериментальних системах на основі тютюну або *Nicotiana benthamiana* рівень накопичення рекомбінантного білка залежить не лише від властивостей трансгену, а й від загального фізіологічного стану рослини та глибини метаболічних змін, викликаних вірусом. У цьому контексті вивчення впливу ВТМ на білковий метаболізм є важливим для правильного тлумачення результатів, пов'язаних із синтезом та накопиченням цільових білків у рослинних тканинах. Це узгоджується з тим, що ВТМ широко використовують

як модель взаємодії «вірус–рослина» і як платформу для експресії цінних білків у рослинах [27].

### **1.5 Фактори, що обмежують накопичення рекомбінантних білків у *N. benthamiana* та *N. tabacum***

Рослини роду *Nicotiana*, насамперед *Nicotiana benthamiana* і *Nicotiana tabacum*, широко використовують як біореактори для синтезу рекомбінантних білків завдяки швидкому росту, значній листовій біомасі, зручності трансформації та здатності до еукаріотичних посттрансляційних модифікацій. Проте навіть у цих модельних системах високий рівень транскрипції не завжди супроводжується таким самим рівнем накопичення цільового білка. Це пов'язано з тим, що кінцевий вихід рекомбінантного продукту визначається не одним фактором, а сукупністю процесів: ефективністю транскрипції, стабільністю мРНК, інтенсивністю сайленсингу, навантаженням на секреторну систему, правильністю згортання білка, активністю ендогенних протеаз, а також фізіологічним станом самої рослини. Саме тому низьке накопичення рекомбінантних білків у тютюнових системах слід розглядати як наслідок комплексних обмежень на різних рівнях організації клітини [28, 29].

Одним із перших рівнів обмеження є конструкція експресійної касети. Для стабільно трансформованих рослин важливими є сила й специфічність промотора, коректність термінації транскрипції, особливості 3'-нетрансльованої ділянки, а також геномний контекст інтеграції трансгену. Навіть за наявності одного й того самого кодувального гена рівень накопичення білка може суттєво змінюватися залежно від того, наскільки ефективно формується зріла мРНК і наскільки стабільною вона залишається в клітині. Для тютюнових систем показано, що оптимізація термінаторів та їх комбінування може помітно підвищувати вихід рекомбінантного репортерного білка, що свідчить про важливість не лише промотора, а й усієї

архітектури конструкції. Для стабільних трансгенних ліній додаткове значення мають позиційний ефект інтеграції та ризик поступового ослаблення експресії внаслідок епігенетичної регуляції. Отже, навіть до початку власне білкового синтезу потенційний рівень накопичення продукту вже може бути частково обмежений на етапі формування й підтримання активної експресії трансгену [30, 31, 32].

Другим важливим чинником є загальна імунна відповідь рослини на чужорідну нуклеїнову кислоту або надмірну експресію трансгену. У *N. benthamiana* ця проблема частково пом'якшена природною високою сприйнятливістю виду, однак навіть у цій системі сайленсинг лишається одним із головних бар'єрів для високого накопичення чужорідного продукту. Сучасні огляди прямо вказують, що ефективність накопичення рекомбінантних білків у *N. benthamiana* найбільше обмежують чотири великі блоки: імунні реакції, деградація транскриптів, стрес ендоплазматичного ретикулуму та протеолітичне руйнування білка. Крім того, показано, що модифікація компонентів RNA-silencing може збільшувати вихід рекомбінантного продукту, хоча це іноді супроводжується небажаними морфологічними змінами рослини. Таким чином, високий рівень синтезу чужорідного білка часто вимагає компромісу між продуктивністю і збереженням нормального фізіологічного стану хазяїна [33, 34].

Накопичення рекомбінантного білка також суттєво обмежується стресом клітини-господаря, який виникає у відповідь на агроінфільтрацію, вірусні вектори або масований синтез чужорідного продукту. Дослідження молекулярних змін в агроінфільтрованих листках *N. benthamiana* показали, що така експресія супроводжується перебудовою транскрипому і метаболізму: пригніченням частини хлоропластних функцій, активацією окисного стресу, посиленням захисних реакцій і змінами клітинної стінки. Це означає, що рослина частину своїх ресурсів перенаправляє не на ріст чи стабільне накопичення цільового продукту, а на адаптацію до стресу. У результаті навіть добре сконструйована система експресії може працювати нижче очікуваного

рівня, якщо синтез рекомбінантного білка супроводжується сильним метаболічним навантаженням. Для білків, що потребують складного дозрівання, таке навантаження особливо критичне, оскільки поєднується з високими витратами енергії на транспорт, згортання та контроль якості в секреторному шляху [36].

Окремим великим блоком обмежень є правильне згортання білка, його складання та вибір субклітинної локалізації. Для простих цитозольних білків ці труднощі можуть бути меншими, однак для секреторних, мембранних, багатосубодиничних або глікозильованих молекул саме ендомембранна система стає вузьким місцем. Неправильне згортання, затримка в ендоплазматичному ретикулумі, неповне складання субодиниць, перевантаження шаперонної системи і помилки транспорту різко знижують вихід кінцевого продукту. Тому сьогодні одним із ключових способів підвищення накопичення білка в тютюнових системах вважають правильний вибір компартмента: цитозоль, ендоплазматичного ретикулуму, вакуолі, хлоропласту або апопласту. Для тютюнових біореакторів показано, що субклітинна адресація прямо впливає і на стабільність білка, і на його посттрансляційні модифікації, і на чутливість до деградації. Іншими словами, одна й та сама молекула може накопичуватися на принципово різних рівнях залежно від того, куди саме її спрямовано всередині клітини [37].

Нарешті, на рівень накопичення рекомбінантних білків впливають фізіологічний стан рослини та умови вирощування. Для *N. benthamiana* показано, що освітлення, вологість, температура, забезпеченість елементами живлення та вік листка можуть змінювати ефективність експресії. Ці чинники діють не ізольовано: вони впливають на фотосинтез, забезпечення амінокислотами, водний режим, інтенсивність стресових реакцій та загальну метаболічну ємність клітини. Тому навіть за однакової генетичної конструкції різні умови вирощування можуть давати відчутно різний вихід білка. Для стабільно трансформованих рослин це має не менше значення, ніж для транз'єнтних систем, оскільки фоновий фізіологічний стан тканини визначає,

наскільки ефективно реалізується потенціал вже інтегрованого трансгену. Отже, накопичення рекомбінантного білка в *N. benthamiana* та *N. tabacum* є результатом взаємодії молекулярних, клітинних і фізіологічних факторів, і саме такий комплексний підхід є необхідним для правильного тлумачення експериментальних результатів [38].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Асептична обробка рослинного матеріалу

Для проведення стерильної обробки рослинного матеріалу використовували такі матеріали та обладнання:

- насіння *Nicotiana benthamiana*;
- 10% розчин «Білизни» на основі гіпохлориту натрію;
- стерильна дистильована вода;
- стерильні мікропробірки;
- ламінарний бокс;
- агаризоване живильне середовище MS;
- стерильні чашки Петрі.

#### Методика проведення дослідження:

1. Для запобігання контамінації на етапі пророщування *in vitro* насіння рослини *Nicotiana benthamiana* піддавали поверхневій стерилізації. Сухе насіння поміщали у 10% розчин «Білизни» — комерційного засобу на основі гіпохлориту натрію, який має ефективні антисептичні властивості. Обробку проводили протягом 10 хвилин у стерильних мікропробірках. Для забезпечення максимальної стерильності всі маніпуляції виконувалися в умовах ламінарного боксу, що дозволяло мінімізувати ризик мікробної контамінації.
2. Після завершення дезінфекції насіння ретельно промивали стерильною дистильованою водою для повного видалення залишків гіпохлориту натрію, який у високих концентраціях може негативно впливати на проростання. Промивання здійснювали тричі поспіль, кожне тривалістю 10 хвилин, при цьому воду замінювали перед кожним новим циклом.

Такий підхід дозволяв ефективно очистити насіння та забезпечити його життєздатність для подальшого пророщування.

Оброблене та промите насіння асептично висівали на поверхню агаризованого живильного середовища MS, що містило в своєму складі необхідні макро- та мікроелементи, а також вітаміни, які сприяють проростанню та ранньому розвитку сіянців. Середовище розливали у стерильні чашки Петрі, попередньо автоклавовані, після чого висівали насіння рівномірно, зберігаючи відстань між окремими зернами для зручності подальшого росту. Усі дії виконували в ламінарному боксі для збереження стерильності[39].

Подальше вирощування рослин здійснювалося в тепличних умовах за температури +24 °С. Світловий режим складався з 16 годин освітлення,

## 2.2 Культивування рослинного матеріалу *in vitro*

Для культивування рослинного матеріалу *in vitro* використовували такі матеріали та обладнання:

- стерилізований рослинний матеріал;
- експланти у вигляді міжвузлів;
- живильне середовище  $\frac{1}{2}$  MS;
- стерильні пробірки або чашки Петрі.

### Методика проведення дослідження:

1. Рослинний матеріал піддавали стерилізації з метою уникнення контамінації. Після цього рослини асептично розділяли на фрагменти — міжвузля, які використовувалися як експланти для культивування *in vitro*. Кожен фрагмент акуратно переносили в пробірки або чашки Петрі, що містили живильне середовище  $\frac{1}{2}$  MS.

2. Для підтримання життєздатності рослинних культур та стимуляції їхнього подальшого росту проводили регулярне пересаджування (субкультивування) експлантів на свіже живильне середовище. Цю процедуру виконували кожні три тижні. Регулярне пересаджування дозволяло уникнути виснаження поживних речовин у середовищі, попередити накопичення токсичних метаболітів, а також сприяло кращому росту та морфогенезу тканин.

**Таблиця 2.1** Склад поживних середовищ, застосованих у дослідженні  
(компоненти вказано в розрахунку на 1 дм<sup>3</sup>)

Речовини	Вміст сполук у середовищах, г	
	MS	½ MS
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33,000	16,500
KNO <sub>3</sub>	38,000	19,000
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	7,400	3,700
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,400	1,700
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	8,800	4,400
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,310	0,310
MnSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,1205	0,1205
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,530	0,530
KI	0,415	0,415
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,125	0,125
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025

CaCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
Інозит	0,1	0,1
Біотин	0,001	0,001
Піридоксин	0,1	0,1
Тіамін	0,1	0,1
Нікотинова кислота	0,01	0,01
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,027	0,027
Na-ЕДТА	0,037	0,037
Сахароза	40,000	20,000
Агар	7,000	7,000
pH середовища	5,75	5,75

### 2.3 Підготовка бактеріальної культури

Для підготовки бактеріальної культури використовували такі матеріали та обладнання:

- бактеріальну культуру *Agrobacterium tumefaciens*;
- рідке живильне середовище LB;
- колби для культивування бактерій;
- лабораторний шейкер;
- стерильні пробірки;
- 10 мМ розчин MgSO<sub>4</sub>;
- центрифугу.

### Методика проведення дослідження:

1. Бактеріальну культуру *Agrobacterium tumefaciens* вирощували на рідкому живильному середовищі LB[40]. Середовище забезпечувало необхідні умови для активного росту бактерій завдяки вмісту поживних речовин.
2. Бактеріальну суспензію інкубували протягом 48 годин при температурі +27 °С, що є оптимальною для росту *A. tumefaciens*. Культуру розміщували у колбах з поживним середовищем і розміщували на лабораторному шейкері, де вона постійно струшувалась з частотою 180–200 об/хв. Це дозволяло досягти ефективної аерації — насичення суспензії киснем, необхідним для метаболізму та розмноження бактерій. Крім того, постійне перемішування запобігало осіданню клітин на дно колби та забезпечувало рівномірний ріст популяції.
3. По завершенню інкубації бактеріальні клітини відокремлювали від культурального середовища шляхом центрифугування. Суспензію переносили у стерильні пробірки та центрифугували при 300 об/хв протягом 10 хвилин. Після цього надосадову рідину акуратно зливали, а отриманий бактеріальний осад ресуспендували у стерильному 10 мМ розчині сульфату магнію (MgSO<sub>4</sub>). Цей буфер забезпечував ізотонічні умови для збереження життєздатності клітин та був придатним для подальших біотехнологічних маніпуляцій, таких як агробактеріальна трансформація рослин або інфікування листкових дисків..

**Таблиця 2.2** Склад середовища LB (1 дм<sup>3</sup>)

Речовини	Вміст сполук (г)
Триптон	10
Дріжджовий екстракт	5
NaCl	5
pH	7,0-7,2

## 2.4 Агробактеріальна трансформація тютюнів

### Методика проведення дослідження:

1. Для детального вивчення можливих відмінностей у розвитку системної вірусної реакції на молекулярному рівні, в якості модельної системи було обрано трансгенні рослини виду *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*. Ці рослини були генетично модифіковані шляхом введення гена *gfp*.
2. Для генетичної трансформації рослин *Nicotiana benthamiana* використовували суспензію бактерій *Agrobacterium tumefaciens*, яка несла в собі векторну конструкцію під назвою pNPB0108 [41]. Цей вектор використовувався для доставки необхідного генетичного матеріалу в клітини рослин. Селекцію трансгенних пагонів проводили на фосфінотрицині. Рослини відбирали за візуальною флуоресценцією в присутності жовтого світлофільтра при опроміненні світлом з довжиною хвилі 385 нм. Рослини *N. tabacum*, які експресують ген *gfp* були отримані з колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ.

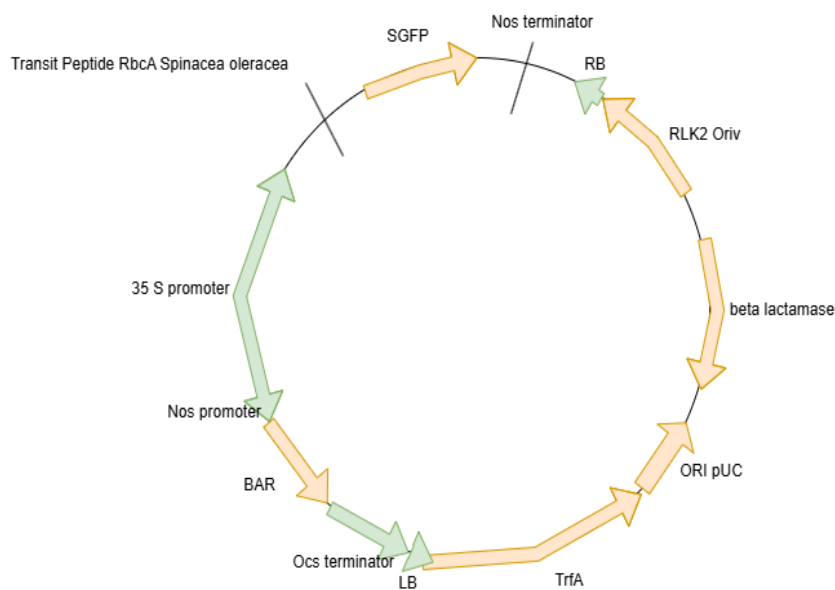


Рис 2.3 Схема генетичної конструкції pNPB0108

## 2.5 Підготовка та акліматизація рослин до тепличного середовища

Для підготовки та акліматизації рослин до тепличного середовища використовували такі матеріали:

- рослини тютюну після етапу *in vitro* культивування;
- горщики типу Р9 (9×9 см);
- торф'яний субстрат TS1;
- прозорі пластикові ковпаки або мікропарники.

### Методика проведення дослідження:

1. Після завершення етапу *in vitro* культивування рослини тютюнів піддавали поступовій адаптації до умов *ex vitro*. На першому етапі їх висаджували у стерильні герметичні контейнери з агаризованим живильним середовищем MS, що дозволяло забезпечити рослинам оптимальні умови для подальшого росту у напівстерильному середовищі. У таких умовах вони росли до досягнення висоти приблизно 7–8 см. Це сприяло зміцненню кореневої системи та поступовому звиканню до менш контрольованого середовища.
2. Після досягнення необхідного розміру рослини пересаджували у горщики типу Р9 (розміри 9×9 см), які були наповнені готовим торф'яним субстратом TS1, що має збалансований склад для забезпечення поживними речовинами на ранніх етапах акліматизації. Для створення умов з високою відносною вологістю (подібною до лабораторних умов) кожену рослину накривали прозорим пластиковим ковпаком або мікропарником. Це дозволяло зменшити транспірацію та уникнути стресу, пов'язаного з різкою зміною вологості повітря.
3. Через два тижні після пересадки, коли рослини достатньо зміцніли та сформували нові листки в умовах підвищеної вологості, ковпаки знімали. Таким чином відбувався поступовий перехід рослин до нормального атмосферного середовища, що знижувало ризик в'янення та загибелі.

- Після завершення адаптаційного періоду всі рослини тютюнів переносили до теплиці з контрольованими кліматичними умовами. Температура повітря підтримувалась на рівні +24 °С, що є оптимальним для росту тютюну. Світловий режим становив 16 годин на добу, з рівнем освітлення близько 15000 люкс, що забезпечувалося за допомогою штучного освітлення. Такі умови сприяли активному фотосинтезу, подальшому росту та розвитку рослин, а також підготовці до наступних етапів експерименту або вирощування у відкритому ґрунті.

## **2.6 Виділення вірусу тютюнової мозаїки**

Для виділення вірусу тютюнової мозаїки використовували такі матеріали та обладнання:

- листки тютюну з характерними симптомами ураження ВТМ;
- буферний розчин для гомогенізації та стабілізації вірусних частинок;
- обладнання для подрібнення рослинної тканини;
- засоби для фільтрації або стерильні пробірки для центрифугування;
- центрифугу;
- буфер для ресуспендування вірусного осаду.

### **Методика проведення дослідження:**

- Для виділення вірусу відбирали рослини тютюну з характерними симптомами ураження вірусом тютюнової мозаїки. До таких симптомів належать мозаїчне забарвлення листків, поява світлих та темних ділянок на листовій пластинці, хлороз, а також деформація листків. Вибір саме

інфікованої тканини дозволяє забезпечити достатню концентрацію вірусних частинок у вихідному матеріалі.

2. Відібрані листки промивали для видалення поверхневих забруднень та механічних домішок. Після цього рослинну тканину подрібнювали до однорідної маси. Подрібнення проводили з метою руйнування клітинних структур рослини та вивільнення вірусних частинок у рідку фазу. На цьому етапі відбувається перехід вірусу з клітин рослини до отриманої суспензії.
3. Подрібнену рослинну тканину змішували з відповідним буферним розчином для стабілізації вірусних частинок та підтримання оптимальних умов середовища. У результаті утворювався гомогенат, який містив вірусні частинки разом із клітинним соком, білками та іншими компонентами рослинної клітини.
4. Отриманий гомогенат піддавали очищенню від великих фрагментів рослинної тканини та клітинних уламків. Для цього використовували фільтрацію або центрифугування. У результаті цього етапу формувалася надосадова рідина, що містила вірусні частинки разом із розчинними компонентами клітини.
5. Для подальшого очищення вірусних частинок застосовували методи диференційного центрифугування [42]. Завдяки різниці у масі та щільності вірусні частинки відокремлювалися від більшості рослинних білків та інших домішок. Під час цього процесу вірусні частинки осідали у вигляді осаду, який потім ресуспендували у буферному розчині.
6. Після завершення етапів очищення отримували препарат вірусу тютюнової мозаїки, придатний для подальших досліджень. Отриманий вірусний матеріал використовували для інфікування експериментальних рослин.

## 2.7 Метод інфікування рослин *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum* вірусом тютюнової мозаїки

Для інфікування рослин використовували такі матеріали та обладнання:

- здорові рослини *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*;
- препарат вірусу тютюнової мозаїки;
- стерильний шприц без голки.

### Методика проведення дослідження:

1. У рамках експерименту контрольні (немодифіковані) та трансгенні рослини *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum* були піддані процедури інфільтрації. Для проведення експерименту відбирали здорові рослини із добре розвиненими листками без ознак пошкоджень або захворювань. Рослини вирощували в контрольованих умовах температури, освітлення та вологості, що забезпечувало їх рівномірний ріст і розвиток та створювало оптимальні умови для подальшого проведення експерименту.
2. Інфікування здійснювали шляхом механічного введення вірусного препарату у листову тканину рослин [43]. Для цього використовували стерильний шприц без голки. Невелику кількість вірусної суспензії вводили безпосередньо у верхню частину листової пластинки, що сприяло проникненню вірусних частинок у клітини рослини. Такий спосіб введення дозволяє ефективно доставити вірус у тканини листка та ініціювати розвиток вірусної інфекції.
3. Після введення вірусного препарату вірусні частинки проникали у клітини листової тканини, де розпочинався процес їх реплікації. У подальшому вірус поширювався між клітинами та поступово транспортувався по рослині через провідну систему, що призводило до системного інфікування рослин.

4. Після проведення інфікування рослини залишали у лабораторних умовах для подальшого росту та розвитку. У наступні дні проводили регулярні спостереження за рослинами з метою виявлення характерних симптомів вірусної інфекції.

## 2.8 Визначення інтенсивності флуоресценції GFP

Метою дослідження було оцінити зміни рівня флуоресценції GFP у рослинах *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum* після інфікування вірусом тютюнової мозаїки. Оскільки ген GFP вже інтегрований у геном досліджуваних рослин, аналіз проводили для визначення змін у рівні його експресії після зараження вірусом. Визначення інтенсивності флуоресценції проводили спектрофотометричним методом, який дозволяє кількісно оцінити рівень накопичення флуоресцентного білка у рослинних тканинах.

1. Для дослідження використовували рослини *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*, що містять ген GFP. Після інфікування вірусом тютюнової мозаїки відбирали листкову тканину.
2. Листки акуратно зрізали, промивали дистильованою водою та висушували на фільтрувальному папері. Після цього рослинну тканину подрібнювали до однорідної маси. Така обробка забезпечувала руйнування клітин та полегшувала подальше виділення білків.
3. Подрібнену тканину гомогенізували у буферному розчині, що забезпечує стабільність білків. У результаті руйнування клітин вивільнялися розчинні білки, включаючи GFP. Отриманий гомогенат центрифугували для видалення клітинних залишків. Надосадову рідину використовували для подальшого аналізу.
4. Визначення інтенсивності флуоресценції GFP проводили за допомогою спектрофлуориметричного рідера для мікропланшет FLUOstar Omega з хвилею збудження довжиною 485, та реєстрацією на 520 нм [44]. Зразки

переносили у мікропланшет. Отримані значення інтенсивності флуоресценції відображали рівень накопичення GFP у рослинній тканині.

5. Отримані показники флуоресценції порівнювали між інфікованими та контрольними рослинами. Це дозволяло визначити, чи змінюється інтенсивність світіння GFP після зараження вірусом, тобто чи відбувається зниження або підвищення рівня експресії білка внаслідок вірусної інфекції.

## 2.9 Визначення загальної концентрації білка у рослинах

Для більш повного аналізу впливу вірусної інфекції на метаболічні процеси у рослинах проводили також визначення загальної концентрації білка у рослинних екстрактах. Оцінка загального вмісту білків у тканинах дозволяє отримати інформацію про загальні зміни у білковому метаболізмі рослини після зараження вірусом, а також використовується для нормалізації результатів при порівнянні рівня експресії окремих білків.

1. Для проведення аналізу використовували листову тканину рослин *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*. Зразки відбирали як з інфікованих рослин, так і з контрольних рослин, які не піддавалися зараженню. Такий підхід дозволяв порівняти зміни у загальному вмісті білків у рослинній тканині залежно від наявності або відсутності вірусної інфекції.
2. Відібрані листки подрібнювали до однорідної маси у буферному розчині. Під час гомогенізації відбувалося руйнування клітинних стінок і мембран, що сприяло переходу внутрішньоклітинних білків у розчин. Для отримання більш однорідного екстракту процес подрібнення проводили ретельно, що забезпечувало максимальне вилучення розчинних білків із рослинної тканини.

3. Отриманий гомогенат центрифугували при відповідних параметрах для відділення клітинних уламків, фрагментів клітинних стінок та інших нерозчинних компонентів. Після центрифугування надосадову рідину, що містила розчинні білки, акуратно відбирали для подальшого аналізу.
4. Концентрацію загального білка у зразках визначали за допомогою стандартного колориметричного методу з використанням реактиву Бредфорда [45]. Після додавання реактиву до досліджуваних зразків відбувалася реакція з білковими молекулами, що супроводжувалася зміною забарвлення розчину. Інтенсивність забарвлення корелювала з концентрацією білка у зразку. Отриманий сигнал вимірювали за допомогою спектрофлуориметра FLUOstar Omega при відповідній довжині хвилі у 595 нм.
5. Після проведення вимірювань отримані значення концентрації білка аналізували та порівнювали між інфікованими та контрольними рослинами. Це дозволяло оцінити, чи змінюється загальний рівень білків у рослинній тканині після зараження вірусом.

## 2.10 Метод імуноферментного аналізу

### Матеріали:

Для проведення дослідження використовували такі буферні розчини: PBS (pH 7,4; 0,1 М), карбонат-бікарбонатний буфер (pH 9,6; 0,05 М), буфер для нанесення антитіл, буфер для відмивки, субстратний буфер та буфер для лужної фосфатази.

### **PBS (pH 7,4; 0,1 М):**

NaCl – 8,0 г;

KCl – 0,2 г;

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,44 г;

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,24 г;

H<sub>2</sub>O – довести до 1 л.

**Карбонат-бікарбонатний буфер (рН 9,6; 0,05 М):**

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 1,59 г;

$\text{NaHCO}_3$  – 2,93 г;

$\text{H}_2\text{O}$  – довести до 1 л.

**Буфер для нанесення антитіл:**

0,1 М PBS;

1% сухого молока;

0,05% Tween 20.

**Буфер для відмивки:**

0,1 М PBS;

0,2% Tween 20.

**Субстратний буфер:**

1 мг субстрату (4-нітрофенілфосфат динатрієва сіль):

10 мл буферу для лужної фосфатази.

**Буфер для лужної фосфатази:**

97 мл концентрованого буферу доводили до 1 л дистильованою водою.

**Методика проведення дослідження:**

1. Рослинний матеріал гомогенізували у фосфатно-сольовому буфері (PBS) у співвідношенні 1:2 (маса/об'єм) для отримання однорідного екстракту, що містить вірусні антигени.
2. Отриманий гомогенат переносили у мікропробірки (епендорфи), розміщували у центрифугі та балансували. Центрифугування проводили протягом 20 хвилин при швидкості 4000 об/хв за температури  $+4^\circ\text{C}$ . Після цього відбирали надосадову рідину (супернатант), яка містила розчинні білки та вірусні антигени.
3. У лунки полістиролового 96-лункового планшета вносили по 100 мкл отриманого супернатанту. До кожної лунки додавали 50 мкл карбонат-бікарбонатного буферу. Лунка К1 слугувала контролем та містила лише антиген.

4. Планшет інкубували протягом ночі при температурі +4°C для адсорбції антигену на поверхні лунок.
5. Після інкубації планшет тричі промивали буфером для відмивки протягом 3 хвилин для видалення незв'язаних компонентів.
6. У кожну лунку вносили 200 мкл блокувального розчину (1–5% BSA або сухого знежиреного молока в PBS/TBS) та інкубували 30–60 хвилин при кімнатній температурі.
7. Після блокування планшет промивали 3 рази буфером для відмивання.
8. У кожну лунку вносили по 100 мкл первинних антитіл у кінцевому розведенні 1:25000. Лунка K2 використовувалась як контроль без первинних антитіл. Використовували поліклональні кролячі антитіла проти вірусного антигену.
9. Планшет інкубували при відповідних умовах для забезпечення специфічного зв'язування антитіл з антигеном.
10. Після інкубації планшет знову тричі промивали буфером для відмивки протягом 3 хвилин.
11. У лунки вносили вторинні антитіла у розведенні 1:30000. Лунка K3 слугувала контролем без вторинних антитіл. Вторинні антитіла були кон'юговані з лужною фосфатазою.
12. Планшет інкубували протягом 2 годин при температурі +37°C.
13. Після інкубації планшет тричі промивали буфером для відмивки (по 3 хвилини) та один раз PBS.
14. У лунку A1 додавали буфер для нанесення антитіл (контроль), в інші лунки — субстратний буфер. Інкубацію проводили протягом 1 години при кімнатній температурі.
15. Для перевірки активності вторинних антитіл окремо змішували краплі розчину вторинних антитіл і субстратного буферу на предметному склі. Поява жовтого забарвлення свідчила про коректність проведення реакції.

16. Оптичну щільність визначали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 405 нм.

Отримані значення використовували для оцінки наявності та рівня накопичення вірусного антигену у досліджуваних зразках рослинного матеріалу [46].

### 2.11 Методика виділення РНК

1. Зразки рослинного матеріалу масою близько 100 мг гомогенізували у 200 мкл лізуючого буфера до отримання однорідної суспензії.

2. До отриманого гомогенату додавали 6 мкл Carrier та 50 мкл Proteinase K, після чого суміш ретельно перемішували.

3. Інкубацію проводили при температурі +56 °C протягом 18 хвилин для забезпечення лізису клітин та деградації білків.

4. Після інкубації зразки центрифугували протягом 6 хвилин при 8000 об/хв.

5. До надосадової рідини додавали 50 мкл буфера для зв'язування нуклеїнових кислот і переносили суміш у чисті мікропробірки.

6. Додавали 200 мкл етанолу (96%), перемішували та інкубували 3 хвилини при кімнатній температурі.

7. Отриману суміш переносили у сорбційну колонку та центрифугували протягом 2 хвилин при 8000 об/хв. Рідину, що пройшла через колонку, видаляли [47].

8. Колонку переносили у нову збірну пробірку, додавали 700 мкл буфера для промивання (Wash buffer 1) та центрифугували 2 хвилини при 8000 об/хв.

9. Після цього колонку знову переносили у чисту пробірку, додавали 500 мкл буфера для промивання (Wash buffer 2) та центрифугували 2 хвилини при 8000 об/хв.

10. Для повного видалення залишків етанолу колонку додатково центрифугували протягом 5 хвилин при 8000 об/хв.
11. Буфер для елюції попередньо підігрівали до температури +56 °С.
12. Колонку переносили у нову стерильну мікропробірку, у центр мембрани вносили 30 мкл буфера для елюції.
13. Інкубували 3 хвилини при кімнатній температурі для підвищення ефективності елюції РНК.
14. Після інкубації проводили центрифугування протягом 10 хвилин при 8000 об/хв для збору очищеної РНК у пробірці.
15. Колонку видаляли, а отриманий елюат, що містить тотальну РНК, використовували для подальших досліджень або зберігали при температурі –20 °С.

## 2.12 Методика проведення ЗТ-ПЛР

1. Загальну РНК виділяли з листкової тканини рослин *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*. Для цього використовували стандартні методи екстракції, що забезпечують отримання очищеної РНК, придатної для подальшого аналізу.
2. Отриману РНК оцінювали спектрофотометрично, визначаючи концентрацію та чистоту зразків. Це дозволяло переконатися у придатності РНК для подальшого проведення реакції зворотної транскрипції.
3. Для синтезу кДНК використовували РНК. Реакцію зворотної транскрипції проводили із застосуванням ферменту M-MuLV RT (Thermo Scientific) у загальному об'ємі 20 мкл. До складу реакційної суміші входили 3 мкл РНК, 2 мкл буфера, 2 мкл dNTP, 2 мкл специфічних праймерів TMV Gold, 0,2 мкл інгібітора РНКаз, 1 мкл ферменту M-MuLV RT та 9,8 мкл деіонізованої води. Синтезовану кДНК надалі використовували для ампліфікації фрагментів ВТМ

методом ПЛР [48]. Отриману кДНК використовували як матрицю для ампліфікації. До реакційної суміші додавали специфічні праймери до геному вірусу, Таq-полімераза, дНТФ, буфер та  $MgCl_2$ . Ампліфікацію проводили у термоциклері за стандартною програмою, яка включала початкову денатурацію, серію циклів денатурації, відпалу праймерів та елонгації, а також фінальну елонгацію.

4. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили з використанням отриманої кДНК як матриці. Реакційну суміш готували у кінцевому об'ємі 25 мкл. До її складу входили 12,5 мкл  $2\times$  Master Mix, по 1 мкл прямого та зворотного праймерів, 3 мкл кДНК та 7,5 мкл стерильної деіонізованої води.
5. Ампліфікацію проводили в термоциклері за наступним режимом: початкова денатурація при  $95\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 3 хвилин; далі 30 циклів, що включали денатурацію при  $95\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 30 с, відпал праймерів при  $55\text{--}60\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 30 с (залежно від температури плавлення праймерів) та елонгацію при  $72\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 30 с; завершальна елонгація при  $72\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 5 хвилин.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Візуальна оцінка симптомів інфікування рослин вірусом ВТМ

На першому етапі дослідження було проведено візуальну оцінку морфологічного стану рослин *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum* після інфікування вірусом тютюнової мозаїки. Такий аналіз дозволив попередньо встановити наявність характерних симптомів вірусного ураження, оцінити динаміку їх розвитку та порівняти реакцію двох досліджуваних видів рослин на інфікування ВТМ. Візуальна оцінка була необхідною для підтвердження розвитку інфекційного процесу перед подальшим аналізом накопичення вірусу та змін експресії GFP.

На рисунку представлено результати візуальної оцінки стану рослин *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum* через 2 та 3 тижні після інфікування вірусом ВТМ. Для кожної групи наведено контрольні (неінфіковані) рослини та інфіковані зразки.

Через 2 тижні після інфікування у рослин *Nicotiana benthamiana* спостерігалися перші ознаки вірусного ураження, які проявлялися у вигляді мозаїчності листової пластинки, що характеризується чергуванням світло-зелених та темно-зелених ділянок. Також відзначався локальний хлороз, слабка деформація листків та незначна хвилястість їх країв. У контрольних рослин ці ознаки були відсутні — листки мали однорідне зелене забарвлення, правильну форму та нормальний розвиток.

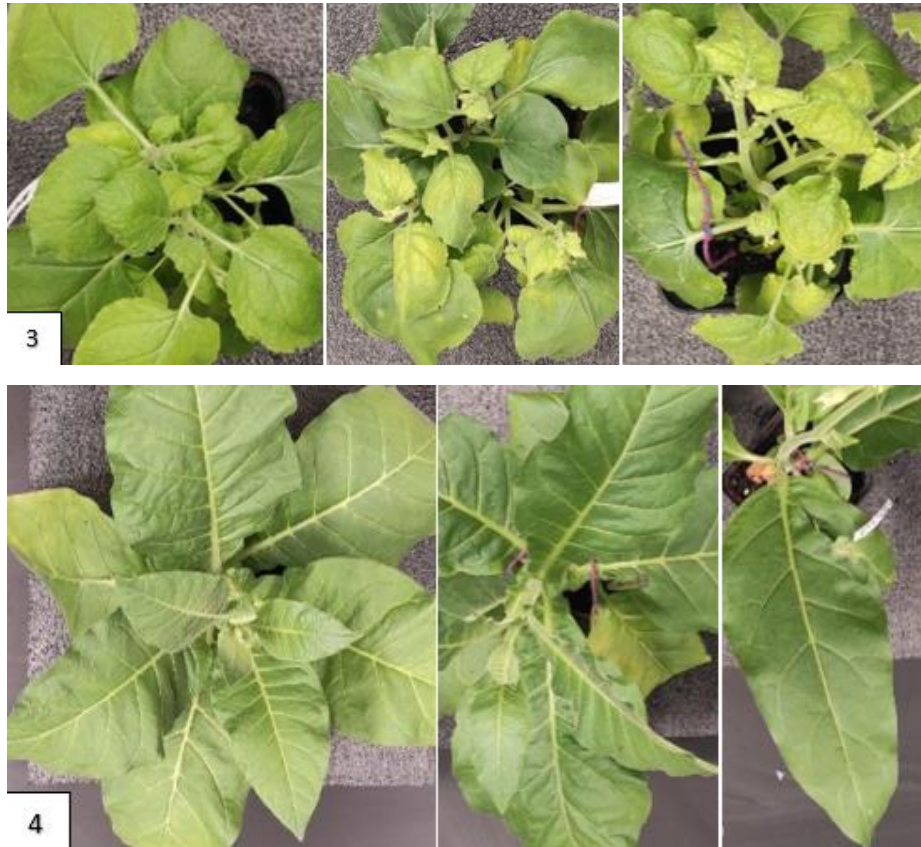
Аналогічні симптоми спостерігалися і у *Nicotiana tabacum* через 2 тижні після інфікування, однак вони були менш вираженими. Зокрема, відмічалася слабка мозаїчність і незначний хлороз без суттєвих деформацій листової пластинки, що свідчить про менш інтенсивний прояв симптомів у порівнянні з *Nicotiana benthamiana*.

Через 3 тижні після інфікування симптоми ураження значно посилювалися. У рослин *Nicotiana benthamiana* спостерігалось виражене посилення мозаїчного малюнка, збільшення площі хлоротичних ділянок, а також суттєва деформація листків, включаючи їх скручування та нерівномірний ріст. Крім того, відмічалось загальне пригнічення розвитку рослин, що проявлялось у зменшенні розміру листків та зміні архітектури рослини.

У *Nicotiana tabacum* на третьому тижні інфікування також спостерігалось посилення симптомів, зокрема більш виражений хлороз і мозаїчність, однак ступінь деформації листків залишався менш інтенсивним, ніж у *Nicotiana benthamiana*. Це свідчить про відмінності у чутливості досліджуваних видів до вірусу ВТМ.

Таким чином, результати візуального аналізу підтверджують розвиток вірусної інфекції вже на ранніх етапах (через 2 тижні після інфікування) з подальшим прогресуванням симптомів та їх посиленням через 3 тижні. Найбільш чутливим до інфікування виявився вид *Nicotiana benthamiana*, у якого симптоми проявлялися раніше та інтенсивніше.





**Рис. 3.1** Візуальні симптоми інфікування ВТМ у рослин *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum* через 2 та 3 тижні після зараження: (1) — *N. benthamiana*, 2 тижні; (2) — *N. tabacum*, 2 тижні; (3) — *N. benthamiana*, 3 тижні; (4) — *N. tabacum*, 3 тижні.

У представленому зображенні чітко видно різницю між трансформованими рослинами, що містять ген GFP, та рослинами дикого типу: трансгенні рослини демонструють інтенсивну зелену флуоресценцію під УФ-освітленням, тоді як у рослин дикого типу такий сигнал відсутній.



**Рис. 3.2** Візуалізація експресії GFP у трансгенних рослинах *Nicotiana benthamiana* під УФ-освітленням: зліва - *Nicotiana benthamiana* дикий тип; справа - сигнал зеленої флуоресценції GFP

Таким чином, результати візуальної оцінки показали, що інфікування вірусом тютюнової мозаїки супроводжувалося розвитком характерних симптомів вірусного ураження у рослин *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*. Симптоми проявлялися у вигляді мозаїчності, хлорозу та деформації листкової пластинки, причому більш виражену реакцію на інфікування було відмічено у рослин *Nicotiana benthamiana*. Це свідчить про вищу чутливість цього виду до ВТМ порівняно з *Nicotiana tabacum*.

### **3.2 Оцінка накопичення ВТМ у рослинах *Nicotiana benthamiana* методом непрямого ІФА**

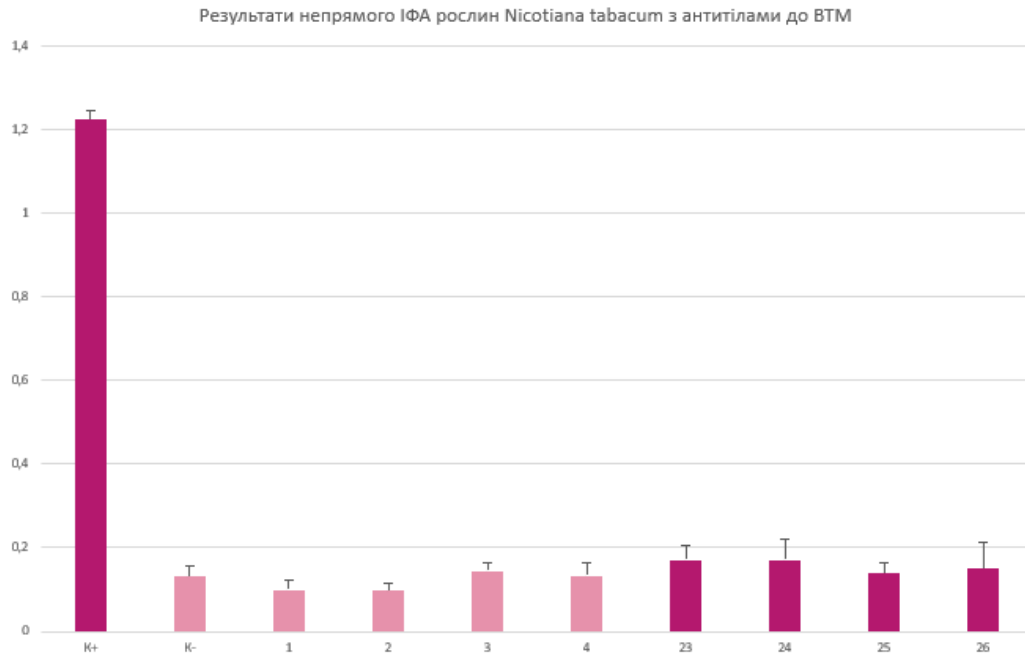
Для підтвердження розвитку ВТМ-інфекції та кількісної оцінки накопичення вірусного антигену в рослинних тканинах було проведено непрямий імуоферментний аналіз. Цей метод дозволяє виявити наявність вірусних білків у зразках за рахунок специфічної взаємодії антигену з

антитілами та подальшої реєстрації ферментативної реакції. На відміну від візуальної оцінки симптомів, ІФА дає змогу не лише підтвердити факт інфікування, а й порівняти інтенсивність накопичення ВТМ у різних групах рослин. Тому цей етап дослідження був необхідний для об'єктивної оцінки рівня вірусного навантаження у *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*.

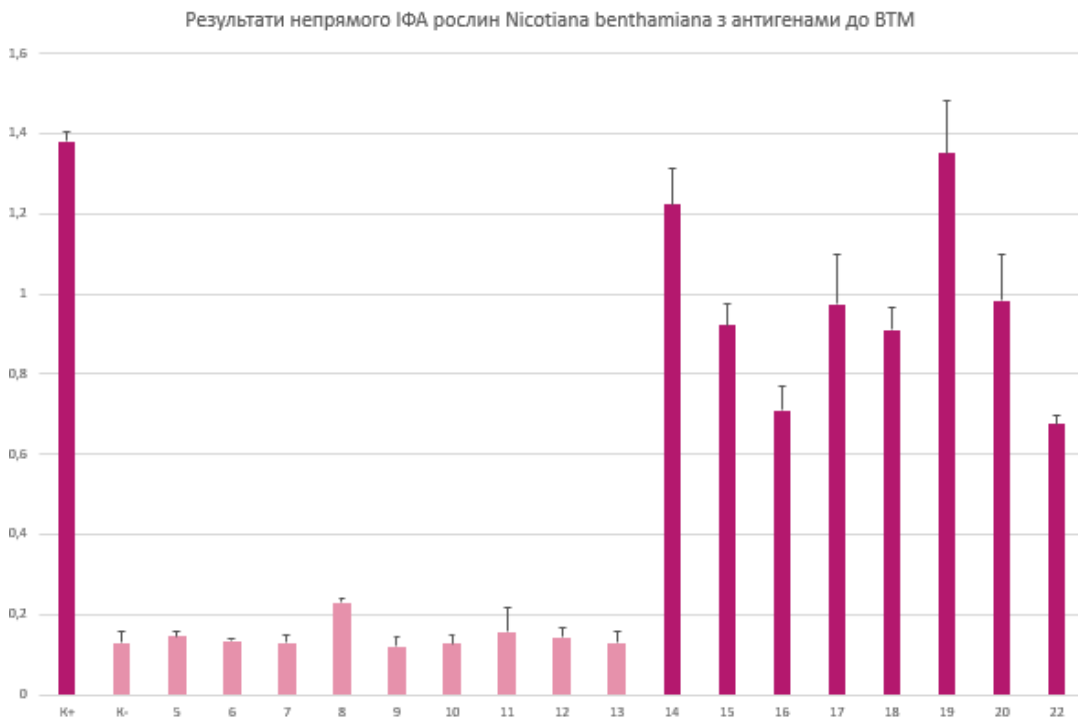
Результати непрямого імуноферментного аналізу (ІФА) дозволили оцінити рівень накопичення вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) у досліджуваних рослинних зразках шляхом визначення оптичної густини (OD) та її порівняння з відповідними контролюми. Значення оптичної густини для негативного контролю перебували на рівні фонового сигналу, тоді як позитивний контроль демонстрував суттєво підвищені значення, що підтверджує коректність проведення аналізу та специфічність використаних антитіл.

У незаражених зразках *Nicotiana tabacum* та *Nicotiana benthamiana*, включаючи як трансгенні рослини з геном GFP, так і рослини дикого типу, значення оптичної густини знаходилися в межах, близьких до негативного контролю. Це свідчить про відсутність специфічної взаємодії антитіл із вірусним антигеном та підтверджує відсутність ВТМ у цих рослинах. Низький рівень сигналу також вказує на відсутність неспецифічного зв'язування, що є важливим показником достовірності результатів, що представлено на рисунку.

У зразках *Nicotiana benthamiana*, які були інфіковані вірусом, спостерігалось значне підвищення оптичної густини порівняно з негативним контролем. Значення OD у цих зразках значно перевищували фоновий рівень, що свідчить про наявність вірусного антигену та його накопичення у тканинах рослин. Водночас варто відзначити певну варіабельність показників між окремими зразками, що може бути зумовлено різним ступенем інфікування, неоднорідним розподілом вірусу в рослинних тканинах або індивідуальними фізіологічними особливостями рослин. Вищі значення оптичної густини у деяких зразках можуть свідчити про більш інтенсивну реплікацію вірусу та більший рівень накопичення вірусних частинок.



**Рис. 3.3** Результати непрямого ІФА (ELISA) для виявлення ВТМ у зразках *Nicotiana tabacum*: Зразки 1–4 — *Nicotiana tabacum*, неінфіковані: 1–2 — експресія GFP; 3–4 — контроль. Зразки 23–26 — *Nicotiana tabacum*, інфіковані ВТМ: 23–24 — контроль; 25–26 — експресія GFP.



**Рис. 3.4** Результати непрямого ІФА (ELISA) для виявлення ВТМ у зразках *Nicotiana benthamiana*: 5–13 — *Nicotiana benthamiana*, неінфіковані: 5–8 — конструкція №4; 9–12 — конструкція №8; 13 — контроль, Зразки 14–22

— *Nicotiana benthamiana*, інфіковані ВТМ: 14–17 — конструкція №4; 18–21 — конструкція №8; 22 — контроль.

У зразках *Nicotiana tabacum*, які піддавалися інфікуванню, значення оптичної густини залишалися на рівні, близькому до негативного контролю, що свідчить про відсутність детектованого рівня вірусного антигену. Це може бути пов'язано обмеженим системним поширенням вірусу.

Порівняння з літературними даними (Shin С. Та співавтори) показує, що наявність вірусного антигену не завжди прямо корелює з рівнем накопичення рекомбінантного білка. Зокрема, було продемонстровано, що інфікування ВТМ може не впливати на вихід терапевтичного білка, навіть за наявності симптомів інфекції. У цьому контексті отримані результати свідчать, що детекція вірусу за ІФА відображає рівень його накопичення, але не дозволяє безпосередньо оцінити функціональні наслідки для експресії гетерологічного білка [9].

Водночас дані інших досліджень (Park С.Н. та інші) вказують, що вірусна інфекція може суттєво впливати на клітинний метаболізм і регуляцію експресії генів навіть без значного накопичення вірусних частинок. Аналогічно у нашій роботі відсутність позитивного сигналу ІФА у *N. tabacum* не супроводжувалася збереженням рівня GFP, що свідчить про наявність непрямих ефектів інфекції на трансгенну експресію. Таким чином, результати ІФА необхідно розглядати у поєднанні з іншими методами аналізу [10].

### **3.3 Детекція вірусної РНК ВТМ у рослинах методом ЗТ-ПЛР**

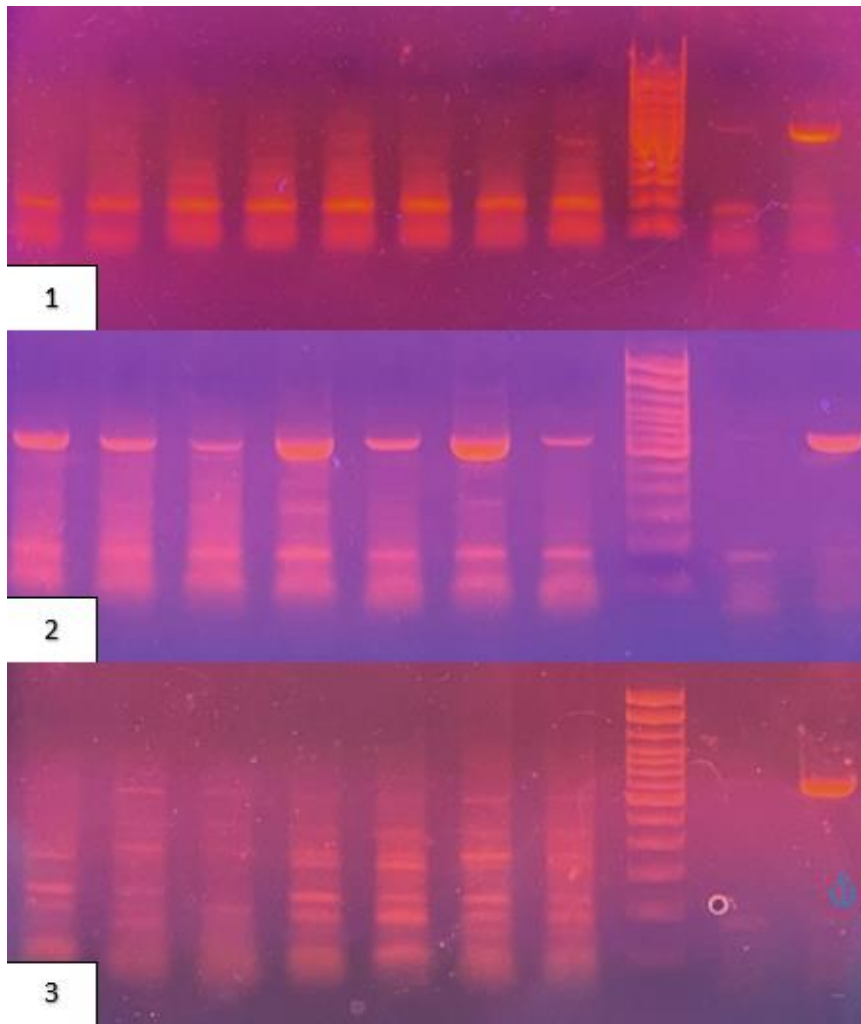
Для молекулярного підтвердження інфікування рослин вірусом тютюнової мозаїки було проведено аналіз методом зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції. На відміну від візуальної оцінки симптомів та ІФА, цей метод дозволяє виявити безпосередньо вірусну РНК, тобто генетичний матеріал ВТМ у рослинних тканинах. Проведення ЗТ-ПЛР було

необхідним для підтвердження наявності вірусу на молекулярному рівні, а також для перевірки специфічності інфікування у контрольних та дослідних зразках *Nicotiana benthamiana* і *Nicotiana tabacum*.

За результатами зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції було проведено якісне визначення наявності вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) у рослин *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum* різних генотипів. Аналіз базувався на виявленні специфічного ампліфікату, що відповідає фрагменту геному вірусу, після попереднього синтезу кДНК на матриці виділеної загальної РНК.

У незаражених (негативних контрольних) зразках обох видів — як у трансгенних лініях із геном GFP, так і у рослин дикого типу — специфічний продукт ампліфікації не виявлявся. Відсутність ампліфікату свідчить про відсутність вірусної РНК у досліджуваних зразках, а також підтверджує відсутність контамінації на етапах виділення РНК, синтезу кДНК та постановки ПЛР. Крім того, це вказує на високу специфічність використаних праймерів до геному ВТМ.

У всіх інфікованих зразках *Nicotiana benthamiana* було виявлено чіткі специфічні ампліфікаційні продукти очікуваного розміру, які відповідали позитивному контролю. Наявність таких ампліфікатів підтверджує присутність вірусної РНК у тканинах рослин і свідчить про успішне інфікування. При цьому вірус детектувався як у трансгенних рослин, що експресують GFP, так і у рослин дикого типу, що дозволяє зробити висновок про відсутність впливу наявності трансгену на факт інфікування або можливість виявлення вірусу методом ЗТ-ПЛР.



**Рис. 3.5** Електрофоретичний аналіз продуктів ЗТ-ПЛР для виявлення вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) у рослинах *Nicotiana tabacum* та *Nicotiana benthamiana*: маркер — маркер молекулярної маси; К<sup>-</sup> — негативний контроль; К<sup>+</sup> — позитивний контроль; зразки — рослини різних генотипів до та після інфікування: гель 1 (*Nicotiana tabacum*): 1–4 — неінфіковані зразки (1–2 — GFP; 3–4 — контроль); 23–26 — інфіковані ВТМ зразки (23–24 — контроль; 25–26 — GFP); маркер — маркер молекулярної маси; К<sup>-</sup> — негативний контроль; К<sup>+</sup> — позитивний контроль. Гель 2 (*Nicotiana benthamiana*, ВТМ): 14–17 — зразки з конструкцією №4; 18–21 — зразки з конструкцією №8; 22 — контроль; маркер — маркер молекулярної маси; К<sup>-</sup> — негативний контроль; К<sup>+</sup> — позитивний контроль. Гель 3 (*Nicotiana benthamiana*, неінфіковані): 5–8 — зразки з конструкцією №4; 9–12 — зразки з конструкцією №8; 13 — контроль; маркер — маркер молекулярної маси; К<sup>-</sup> — негативний контроль; К<sup>+</sup> — позитивний контроль.

Водночас у зразках *Nicotiana tabacum*, які піддавалися інфікуванню за аналогічних умов, специфічний продукт ампліфікації не був виявлений. З огляду на принцип методу, це означає, що вірусна РНК або відсутня у зразках, або її кількість є недостатньою для детекції. Це може бути пов'язано з меншою ефективністю механічного інфікування даного виду, обмеженим поширенням вірусу в тканинах або більш ефективними захисними механізмами рослини, що зменшувало системне поширення вірусних часток. Детекцію проводили на системному рівні, в тканинах значно віддалених від зони інфільтрації вірусу (4-й листок над інокульованим).

Отримані результати свідчать про те, що за використаних експериментальних умов вірус тютюнової мозаїки стабільно детектується у *Nicotiana benthamiana*, тоді як у *Nicotiana tabacum* його наявність методом ЗТ-ПЛР не підтверджена. Таким чином, застосований підхід продемонстрував високу специфічність і надійність для якісного виявлення вірусної РНК, а також дозволив виявити відмінності у сприйнятливості досліджуваних видів рослин до ВТМ. При цьому візуально спостерігали симптоми розвитку хвороби, які в *Nicotiana tabacum* були менш помітними порівняно з *Nicotiana benthamiana*.

У зіставленні з літературними даними (Shin С. Та співавтори) це підтверджує, що наявність вірусної РНК не завжди визначає ступінь впливу на експресію трансгену. У попередніх дослідженнях було показано, що навіть за наявності активної інфекції ВТМ рівень рекомбінантного білка може залишатися стабільним. У нашій роботі, навпаки, у *N. benthamiana* наявність вірусної РНК супроводжувалася лише помірним зниженням GFP, тоді як у *N. tabacum* відсутність детектованої вірусної РНК поєднувалася з більш вираженим пригніченням експресії білка. Це свідчить про складний характер взаємодії між вірусом і трансгенною системою [9].

Результати також узгоджуються з даними (Park С.Н. та інші) про те, що вірусна інфекція може змінювати експресію трансгенів через метаболічні та регуляторні механізми, незалежно від рівня накопичення вірусу. Таким чином,

ЗТ-ПЛР дозволяє підтвердити факт інфікування, але не дає повної інформації про функціональні наслідки для клітини, що підкреслює необхідність комплексного підходу до аналізу [10].

### **3.4 Аналіз флуоресценції GFP у трансгенних рослинах до та після інфікування ВТМ**

Для оцінки того, чи впливає інфікування вірусом тютюнової мозаїки на рівень накопичення гетерологічного білка, було проведено флуоресцентний аналіз GFP у трансгенних рослинах. Оскільки GFP є репортерним білком, інтенсивність його флуоресценції можна використовувати як показник рівня експресії трансгену. Цей етап дослідження був необхідний для порівняння експресії GFP у рослин до та після інфікування ВТМ, а також для встановлення можливого пригнічення або зміни накопичення рекомбінантного білка під впливом вірусної інфекції.

Флуоресцентний аналіз GFP було проведено через тиждень після проведення ІФА для оцінки рівня експресії рекомбінантного білка у трансгенних рослинах *Nicotiana tabacum* та *Nicotiana benthamiana* до та після інфікування вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ). Для *Nicotiana benthamiana* досліджували дві трансгенні лінії: лінію №4 (GFP 1) та лінію №8 (GFP 2).

У трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* до інфікування спостерігався високий рівень флуоресценції GFP, який становив близько 3,0 умовних одиниць. Після інфікування ВТМ цей показник різко знижувався до приблизно 0,37, що свідчить про суттєве пригнічення експресії GFP у відповідь на вірусне ураження. У контрольних (нетрансгенних) рослин рівень флуоресценції залишався низьким як до ( $\approx 0,07$ ), так і після інфікування ( $\approx 0,19$ ), що підтверджує специфічність сигналу GFP.

Аналогічну тенденцію спостерігали у *Nicotiana benthamiana*, однак із певними відмінностями між трансгенними лініями. У лінії №4 (GFP 1) до

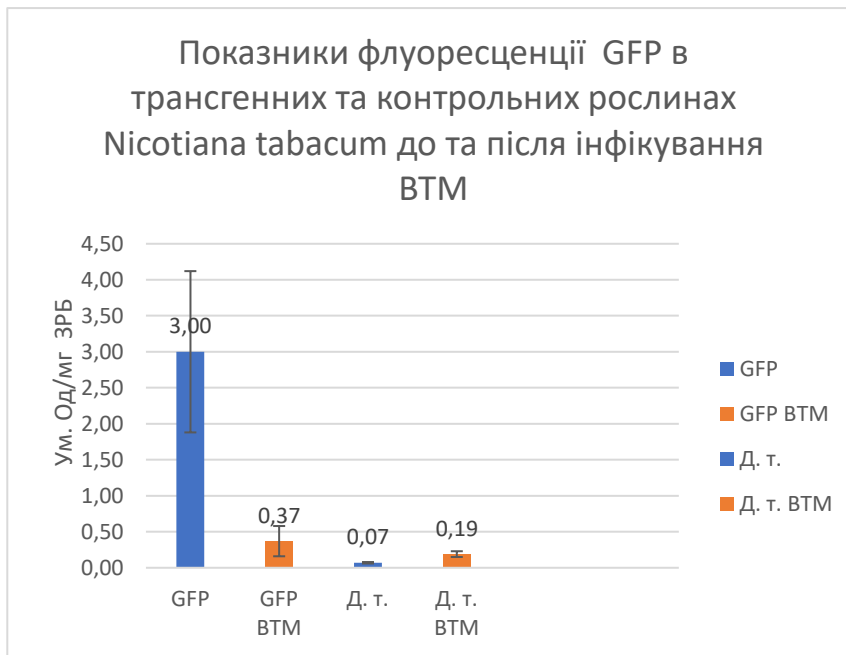
інфікування рівень флуоресценції становив близько 2,68, тоді як після інфікування він знижувався до 1,15. У лінії №8 (GFP 2) початковий рівень флуоресценції був дещо нижчим ( $\approx 2,08$ ), а після інфікування зменшувався до 1,38.

Таким чином, в обох трансгенних лініях *Nicotiana benthamiana* спостерігається зниження рівня флуоресценції GFP після інфікування ВТМ, однак ступінь пригнічення є менш вираженим порівняно з *Nicotiana tabacum*. Зокрема, у лінії №4 відзначається більш суттєве зниження сигналу, тоді як лінія №8 демонструє відносно вищу стабільність експресії GFP після інфікування.

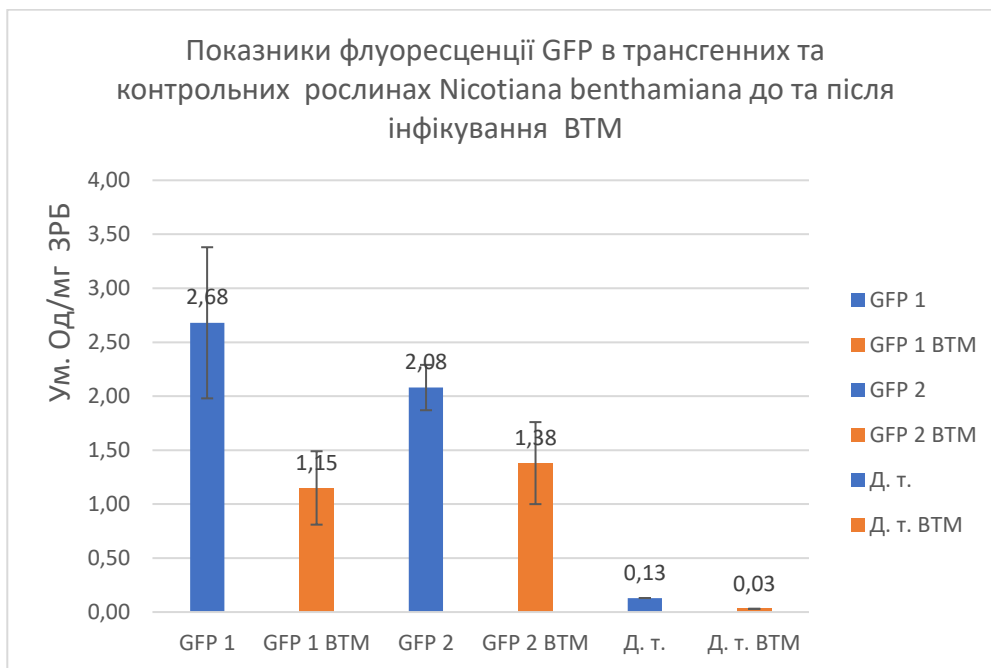
У контрольних рослин *Nicotiana benthamiana* рівень флуоресценції залишався мінімальним ( $\approx 0,13$  до інфікування та  $\approx 0,03$  після), що підтверджує відсутність неспецифічного сигналу.

Отримані результати свідчать про те, що інфікування ВТМ призводить до пригнічення експресії GFP у трансгенних рослинах, причому ступінь цього ефекту залежить як від виду рослини, так і від трансгенної лінії. *Nicotiana benthamiana* виявляє більшу стабільність експресії трансгену порівняно з *Nicotiana tabacum*, а також спостерігаються відмінності між окремими лініями, що може бути пов'язано з особливостями інтеграції та регуляції трансгену.

Порівняння з літературними даними (Shin С. Та співавтори) показує, що вплив ВТМ на експресію рекомбінантних білків може варіювати від відсутності ефекту до значного пригнічення. У деяких системах було показано, що інфекція ВТМ не знижує рівень терапевтичного білка, що свідчить про стабільність експресійної системи. У нашому випадку, навпаки, спостерігалось чітке зниження GFP, особливо у *N. tabacum*, що може бути пов'язано з відмінностями у конструкції трансгену, рівні його експресії або фізіологічному стані рослин [9].



**Рис. 3.6** Показники флуоресценції GFP у трансгенних та контрольних рослинах *Nicotiana tabacum* до та після інфікування вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ): GFP — трансгенні рослини до інфікування; GFP ВТМ — трансгенні рослини після інфікування; Д. т. — дикого типу (контроль) до інфікування; Д. т. ВТМ — контрольні рослини після інфікування. Значення наведені як середні й похибка.



**Рис. 3.7** Показники флуоресценції GFP у трансгенних та контрольних рослинах *Nicotiana benthamiana* (лінії №4 та №8) до та після інфікування вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ): GFP 1 (лінія №4) та GFP 2 (лінія №8) —

трансгенні рослини до інфікування; GFP 1 ВТМ та GFP 2 ВТМ — відповідні рослини після інфікування; Д. т. — дикого типу (контроль) до інфікування; Д. т. ВТМ — контрольні рослини після інфікування. Значення наведені як середній похибка.

Разом із тим отримані результати добре узгоджуються з даними (Park С.Н. та інші) про те, що вірусна інфекція може пригнічувати експресію трансгенів через перебудову клітинного метаболізму. Було показано, що віруси здатні змінювати регуляцію генів, пов'язаних із вторинним метаболізмом, що супроводжується зниженням активності трансгенів. Аналогічно, у нашій роботі навіть за відсутності детектованого вірусу в *N. tabacum* спостерігалось різке зниження GFP, що свідчить про можливу роль непрямих метаболічних ефектів інфекції [10].

## ВИСНОВКИ

1. Інфікування вірусом тютюнової мозаїки призводить до зниження накопичення рекомбінантного білка GFP у трансгенних рослинах *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*, однак ступінь впливу залежить від виду рослини. У *N. tabacum* пригнічення було більш різким, тоді як у *N. benthamiana* воно мало помірніший характер.
2. ВТМ надійно детектувався в інфікованих рослинах *Nicotiana benthamiana* методами ЗТ-ПЛР та ІФА, тоді як у *Nicotiana tabacum* за використаних умов його системне накопичення не було підтвержене. Це свідчить про різну сприйнятливість досліджуваних видів до вірусу та відмінності в характері перебігу інфекції.
3. *Nicotiana benthamiana* виявилася кращою моделлю для того, щоб детектувати ВТМ в рослин, оскільки має високу чутливість до вірусу. Це робить її придатною моделлю для вивчення як динаміки інфекційного процесу, так і молекулярних механізмів взаємодії вірусу з клітинними факторами рослини.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Golubova D, Tansley C, Su H, Patron NJ. Engineering *Nicotiana benthamiana* as a platform for natural product biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* 2024 Oct;81:102611. doi: 10.1016/j.pbi.2024.102611. Epub 2024 Aug 3. PMID: 39098308.
2. Goulet MC, Gaudreau L, Gagné M, Maltais AM, Laliberté AC, Éthier G, Bechtold N, Martel M, D'Aoust MA, Gosselin A, Pepin S, Michaud D. Production of Biopharmaceuticals in *Nicotiana benthamiana*-Axillary Stem Growth as a Key Determinant of Total Protein Yield. *Front Plant Sci.* 2019 Jun 11;10:735. doi: 10.3389/fpls.2019.00735. PMID: 31244869; PMCID: PMC6579815.
3. Ranawaka, B., An, J., Lorenc, M.T. *et al.* A multi-omic *Nicotiana benthamiana* resource for fundamental research and biotechnology. *Nat. Plants* **9**, 1558–1571 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01489-8>.
4. Bally J, Jung H, Mortimer C, Naim F, Philips JG, Hellens R, Bombarely A, Goodin MM, Waterhouse PM. The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annu Rev Phytopathol.* 2018 Aug 25;56:405-426. doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-050141. PMID: 30149789.
5. Zu-Qing Gui, Xiao-Long Yuan, Juan Yang, Yong-Mei Du, Peng Zhang. An updated review on chemical constituents from *Nicotiana tabacum* L.: Chemical diversity and pharmacological properties. *Industrial Crops and Products.* 2024;214:118497. doi:10.1016/j.indcrop.2024.118497.
6. Zhang W, Pan X, Fu J, Cheng W, Lin H, Zhang W and Huang Z (2024) Phytochemicals derived from *Nicotiana tabacum* L. plant contribute to pharmaceutical development. *Front. Pharmacol.* 15:1372456. doi: 10.3389/fphar.2024.1372456.
7. Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant*

- Microbe Interact. 2008 Aug;21(8):1015–1026. doi:10.1094/MPMI-21-8-1015. PMID: 18616398.
8. Shen K, Xia L, Jiao K, Pan F, Xiang B, Zhou W, Shou Y, Gao X, Hu S, Fang H, Xia C, Jiang X, Gao X, Li C, Sun P, Lu G, Fan H, Sun T. Characterization techniques for tobacco and its derivatives: a systematic review. *Front Chem.* 2024;12:1402502. doi:10.3389/fchem.2024.1402502.
  9. Gleba, Y., Marillonnet, S. & Klimyuk, V. (2004). *Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies.* *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), pp. 182–188. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.003>.
  10. Larsen, J. S. & Curtis, W. R. (2012). *RNA viral vectors for improved Agrobacterium-mediated transient expression of heterologous proteins in Nicotiana benthamiana cell suspensions and hairy roots.* *BMC Biotechnology*, 12, 21. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22559055/>
  11. Shin C., Song I., Lee Y., Baek S.-H., Kim D.H., Ko K. *Effect of Tobacco Mosaic Virus (TMV) Infection on Expression and Purification of Therapeutic Vaccine Proteins in Transgenic Plants.* *Horticultural Science and Technology.* 2020;38(2):282–290. doi:10.7235/HORT.20200027.
  12. Park C.H., Yeo H.J., Lim H.-S., Hyeon H., Kim J.K., Park S.U. *Gene Expression and Metabolic Analyses of Nontransgenic and AtPAP1 Transgenic Tobacco Infected with Potato Virus X (PVX).* *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2022;70(19):5838–5848. doi:10.1021/acs.jafc.2c00974.
  13. Luiz A. Cauz-Santos, Steven Dodsworth, Rosabelle Samuel, Maarten J. M. Christenhusz, Denise Patel, Taiwo Shittu, Aljaž Jakob, Ovidiu Paun, Mark W. Chase Genomic insights into recent species divergence in *Nicotiana benthamiana* and natural variation in *Rdr1* gene controlling viral susceptibility.

14. Lindbo JA. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiol.* 2007 Dec;145(4):1232-40. doi: 10.1104/pp.107.106377. Epub 2007 Aug 24. PMID: 17720752; PMCID: PMC2151719.
15. Pogue GP, Huntley CC, Hall TC. Common replication strategies emerging from the study of diverse groups of positive-strand RNA viruses. *Arch Virol Suppl.* 1994;9:181-94. doi: 10.1007/978-3-7091-9326-6\_18. PMID: 8032249.
16. Creager ANH. Tobacco Mosaic Virus and the History of Molecular Biology. *Annu Rev Virol.* 2022 Sep 29;9(1):39-55. doi: 10.1146/annurev-virology-100520-014520. Epub 2022 Jun 15. PMID: 35704746.
17. Hong Y, Zheng Q, Cheng L, Liu P, Xu G, Zhang H, Cao P, Zhou H. Identification and characterization of TMV-induced volatile signals in *Nicotiana benthamiana*: evidence for JA/ET defense pathway priming in congeneric neighbors via airborne (E)-2-octenal. *Funct Integr Genomics.* 2023 Aug 12;23(3):272. doi: 10.1007/s10142-023-01203-z. PMID: 37568053; PMCID: PMC10421810.
18. Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 354(1383), pp. 531–535.
19. Tran P-T, Vo Phan M-S, Citovsky V. Gain-of-function mutant of movement protein allows systemic transport of a defective tobacco mosaic virus. *iScience.* 2022;25(12):105486. doi:10.1016/j.isci.2022.105486.
20. Adams, M., Adkins, S., Bragard, C., Gilmer, D., Li, D., MacFarlane S., Wong, S-M., Melcher, U., Ratti, C. and Ryu K. H. (2017). ICTV virus taxonomy profile: *Virgaviridae*. *Journal of General Virology*, 98(8): pp. 1999–2000.
21. Scholthof KB. Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annu Rev Phytopathol.* 2004;42:13-34. doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140322. PMID: 15283658.

22. Karen-Beth, G. Scholthof. 2005. Tobacco mosaic virus. The Plant Health Instructor. Texas A&M University.
23. Conti, G., Rodriguez, M.C., Venturuzzi, A.L. and Asurmendi, S. (2017). Modulation of host plant immunity by Tobamovirus proteins. *Annals of Botany*, [online] 119(5), pp.737–747. Available at: <https://academic.oup.com/aob/article/119/5/737/2629131>.
24. Das, P.P., Lin, Q. and Wong, S.-M. (2019). Comparative proteomics of Tobacco mosaic virus-infected *Nicotiana tabacum* plants identified major host proteins involved in photosystems and plant defence. *Journal of Proteomics*, [online] 194, pp.191–199. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30503828/>
25. Más, P. and Beachy, R.N. (1999). Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *Journal of Cell Biology*, [online] 147(5), pp.945–958. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2169346/>
26. Lu, Z.-S. et al. (2019). Proteomic and Phosphoproteomic Analysis in Tobacco Mosaic Virus-Infected Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Biomolecules*, [online] 9(2), p.39. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30678100/>
27. Song, L. et al. (2022). Cross-Talk of Protein Expression and Lysine Acetylation in Response to BTM Infection in *Nicotiana benthamiana*. *ACS Omega*, [online] 7(36), pp.32496–32511. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36120045/>.
28. Liu, H. and Timko, M.P. (2022). Improving Protein Quantity and Quality—The Next Level of Plant Molecular Farming. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 23(3), p.1326. Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1326>
29. Beritza, K., Watts, E.C. and van der Hoorn, R.A.L. (2024). Improving transient protein expression in agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana*. *New*

- Phytologist*, [online] 243(3), pp.846–850. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11494410/>
30. Lee, J., Lee, K.-R., Kim, N.-S., Lee, J., Lee, S.-K. and Lee, S. (2024). High-Level Production of a Recombinant Protein in *Nicotiana benthamiana* Leaves Through Transient Expression Using a Double Terminator. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 25(21), p.11573. Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/21/11573>
  31. Wang, P., Si, H., Li, C., Xu, Z., Guo, H., Jin, S. and Cheng, H. (2025). Plant genetic transformation: achievements, current status and future prospects. *Plant Biotechnology Journal*, [online] 23(6), pp.2034–2058. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12120897/>.
  32. Sadravi, S., Lee, J. and Xu, J. (2026). Advances in promoter engineering strategies for enhanced recombinant protein expression in plants. *Frontiers in Plant Science*, [online] 16, p.1747353. Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/plantscience/articles/10.3389/fpls.2025.1747353/full>.
  33. Beritza, K., Watts, E.C. and van der Hoorn, R.A.L. (2024). Improving transient protein expression in agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana*. *New Phytologist*, [online] 243(3), pp.846–850. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11494410/>
  34. Matsuo, K. (2025). Recovery of RNA-dependent RNA polymerase 6 gene-knockout phenotypes in *Nicotiana benthamiana* via in vivo generation of inverted repeat construct of the trans-acting short interference RNA3 sequence. *The Plant Journal*, [online] 123(2), p.e70350. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12274081/>.
  35. Kopertekh L. Improving transient expression in *N. benthamiana* by suppression of the Nb-SABP2 and Nb-COI1 plant defence response related genes. *Front Plant Sci.* 2024;15:1453930. doi:10.3389/fpls.2024.1453930.
  36. Hamel, L.-P., Tardif, R., Poirier-Gravel, F. et al. (2024). Molecular responses of agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves expressing suppressor of

- silencing P19 and influenza virus-like particles. *Plant Biotechnology Journal*, [online] 22(5), pp.1078–1100. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11022802/>
37. Song, S.-J., Diao, H.-P., Guo, Y.-F. and Hwang, I. (2024). Advances in Subcellular Accumulation Design for Recombinant Protein Production in Tobacco. *BioDesign Research*, [online] 6, p.0047. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11350518/>
38. Yüksel, D., Yusifova, G., Hasanova, A.S. and Mamedov, T. (2025). Enhancing Recombinant Protein Production by Optimising Nutrient Replenishment, Light, and Humidity in a *Nicotiana benthamiana* Bioreactor. *European Journal of Biology*, [online] 84(1), pp.132–142. Available at: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/4406509>
39. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*. 1962 Jul;15(3):473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
40. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1951 Jan;62(3):293–300. PMID: 14888646; PMCID: PMC385728.
41. Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 1985 Mar 8;227(4691):1229–1231. doi:10.1126/science.227.4691.1229. PMID:17757866.
42. Stanley WM. Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science*. 1935 Jun 28;81(2113):644–645. doi:10.1126/science.81.2113.644. PMID:17743301.
43. Holmes FO. Local Lesions in Tobacco Mosaic. *Botanical Gazette*. 1929;87(1):39–55. doi:10.1086/333923.
44. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994 Feb 11;263(5148):802–805. doi:10.1126/science.8303295. PMID:8303295.

45. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3. PMID:942051.
46. Koenig R. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J Gen Virol.* 1981 Jul;55(1):53–62. doi:10.1099/0022-1317-55-1-53.
47. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):495–503. doi:10.1128/jcm.28.3.495-503.1990. PMID:1691208.
48. Rappolee DA, Wang A, Mark D, Werb Z. Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. *J Cell Biochem.* 1989 Jan;39(1):1–11. doi:10.1002/jcb.240390102. PMID:2541142.