

УДК 58.084.1:58.085

DOI: 10.20535/1810-0546.2016.3.60469

А.А. Петерсон<sup>1</sup>, М.Ю. Василенко<sup>1</sup>, Ю.С. Прищепа<sup>2</sup>, Л.Б. Орябінська<sup>2</sup>, М.В. Кучук<sup>1</sup><sup>1</sup>Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна<sup>2</sup>Національний технічний університет України "КПІ", Київ, Україна

## ВПЛИВ ОПРОМІНЮВАННЯ СВІТЛОМ СИНЬОГО ДІАПАЗОНУ СПЕКТРА НА ПІДВИЩЕННЯ РІВНЯ ТРАНЗІЄНТНОГО НАКОПИЧЕННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО РЕПОРТЕРНОГО БІЛКА GFP У РОСЛИНАХ *NICOTIANA BENTHAMIANA*

**Background.** Plant expression systems are being increasingly used in scientific and industrial biotechnology. Research of the influence of different factors on efficiency of plant transient expression systems expands scientific basis for large-scale and economically efficient application of these systems in industrial biotechnology.

**Objective.** The object of this research was to determine the influence of Irradiation by blue light of plants *Nicotiana benthamiana* immediately before agroinfiltration on transient accumulation of reporter recombinant protein GFP.

**Methods.** Irradiation of plants was performed using LED light sources ( $\lambda = 440$  nm). Quantity of accumulated reporter protein in plant leaves was measured by fluorimetric method.

**Results.** It was demonstrated that GFP accumulation in irradiated plant biomass was higher than in not irradiated biomass. Increase of level of accumulation was between 60–87 % depending on other agroinfiltration conditions.

**Conclusions.** Shown effect seems to be promising as a methodological procedure either in labs or in industrial practices. That is because the apparatus for irradiation is constructively simple, cheap, energy efficient and a period of irradiation time is short.

**Keywords:** plant expression system; transient expression; *Nicotiana benthamiana*; recombinant protein; green fluorescent protein; GFP.

### Вступ

Наявні повідомлення свідчать про те, що єдиним родом рослин, для якого було розроблено відповідні векторні конструкції та методику транз'єнтно́ї експресії гетерологічного генетичного матеріалу, що в комплексі забезпечують економічно прийнятну ефективність для біофармацевтичного виробництва, є *Nicotiana* [1]. Комерційне застосування отримав вид *Nicotiana benthamiana*, але у науковій практиці також широко використовують види *N. excelsior* і *N. tabacum* [2]. Декілька потужних транснаціональних біотехнологічних компаній зробили багатомільйонні інвестиції в розробку технології, проектування, будівництво та сертифікацію виробництва рекомбінантних білків із використанням *N. benthamiana* як продуцента [3]. Також повідомлялось про асигнування 14 млн дол. з оборонного бюджету США на дослідження транз'єнтно́ї експресії в рослинах [4].

Серед іншого, ефективність транз'єнтного накопичення рекомбінантних білків у рослині залежить від кількості клітин цієї рослини, в якій відбулося перенесення гетерологічного генетичного матеріалу, та від кількості копій цього матеріалу, що був перенесений у рослину клітину. Кількість генетичного матеріалу, що потенційно може бути перенесена в клітини

рослини, залежить від кількості агробактерій, які опинились у міжклітинному просторі в результаті агроінфільтрації рослини, а також від ступеня активності системи переносу Т-ДНК агробактерій. На кількість агробактерій, які потрапляють у міжклітинний простір, впливають механічні обмеження на потрапляння та переміщення суспензії агробактерій у цьому просторі, пов'язані з будовою рослинної тканини, що інфільтрується. На активність системи переносу Т-ДНК, серед іншого, впливає наявність у середовищі індукторів *vir*-генів агробактерій. Відомо, що індукторами *vir*-генів агробактерій є сполуки, які виділяються клітинами рослин при пошкодженні [5]. Синтетичним аналогом деяких із цих сполук є ацетосирингон. Ця сполука набула широкого застосування в лабораторних методах, пов'язаних з агротрансформацією рослин [6].

Агроінфільтраційна техніка, що використовується на біотехнологічних виробництвах, заснована на зануренні рослини в суспензію агробактерій із подальшим вакуумуванням. При застосуванні цього методу відбувається заміщення газового середовища міжклітинного простору рослинних тканин на суспензію агробактерій [7]. І головним шляхом потрапляння бактерій у міжклітинний простір вважаються пори [8].

Стандартизація фізіологічного стану рослин *N. benthamiana*, які призначені для використання як транзйентна експресійна система, зумовлює необхідність культивування цих рослин в умовах кліматичних камер. При цьому застосовуються штучні джерела освітлення. Енергетичні та спектральні характеристики найбільш уживаних у рослинництві типів штучних джерел світла не дають змоги без застосування складного дорогого та енергоємного охолоджувального обладнання створити умови освітлення, які б були еквівалентні умовам освітлення сонячним світлом. Наприклад, за результатами наших вимірювань, питомі світлові потоки фотосинтетично активного випромінювання, що забезпечуються при використанні натрієвих ламп високого тиску, на відстанях, які не потребують застосування додаткового охолодження і теплових екранів, не перевищують значень 25 % від значення цього показника сонячного світла. Також при вимірюванні цього показника навіть безпосередньо на поверхні люмінесцентних ламп різних типів та виробників нам не вдавалось отримати значень, що перевищували б 10 % від сонячного світла.

Відомо, що величина вільного перетину отворів продохів прямо залежить від рівня освітленості. Також відомо, що при освітленні листя рослин прямим сонячним світлом значення вільного перетину продохів не перевищує значень 40–60 % від максимального [9]. Відповідно, можливо зробити припущення, що вільний перетин отворів продохів за умови культивування в теплицях буде мати дуже велику варіацію залежно від погодних умов, що неприпустимо з огляду на необхідність забезпечення відтворюваності експериментів і стандартизації умов виробництва. А за умови культивування в кліматичних камерах, які не обладнані спеціальними пристроями охолодження джерела світла і тепловими екранами, вільний перетин продохів може становити менше 10–15 % від максимального.

Відомо, що фоторецепторна система, яка керує рухом клітин продохів, найбільш чутлива до видимого світла синього діапазону (400–480 нм). Також відомо, що найбільш чутливими до синього світла є клітини продохів абаксіальної поверхні листя [10]. Досліди з кінетики рухів клітин продохів демонструють можливість як досить швидких рухів (рух відбувається протягом кількох хвилин після початку дії відповідного подразника), так і більш повільних рухів (рух відбувається протягом де-

сятків хвилин) [11]. Світлозалежний рух клітин продохів змінює вільний перетин продохів упродовж 30 хв у відповідь на зміну рівня освітленості [10]. Але вільний перетин продохів може істотно зменшуватись протягом декількох хвилин – у відповідь на зменшення вологості повітря, збільшення швидкості вітру, затоплення, контакт антигенів фітопатогенів із відповідними рецепторними комплексами клітин продохів тощо [12, 13].

### Постановка задачі

На нашу думку, в методику агроінфільтрації за допомогою вакуумування необхідно внести додатковий етап, спрямований на штучне збільшення вільного перетину продохів рослин, що інфільтруються. Реалізація поставленої задачі здійснювалася через визначення впливу опромінення рослин *Nicotiana benthamiana* синім світлом безпосередньо перед агроінфільтрацією на рівень транзйентного накопичення рекомбінантного репортерного білка GFP.

### Матеріали і методи

У дослідах використовували штам агробактерій GV3101, що був трансформований бінарним вектором pICH5290, який містить ген репортерного зеленого флюоресціюючого протеїну GFP під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти [14]. Вказаний штам і вектор були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, ФРН).

Агробактерії культивували на середовищі LB протягом доби за температури 28 °C на орбітальному шейкері зі швидкістю 200 об/хв. Індукцію *vir*-генів агробактерій проводили додаванням у живильне середовище 0,1 мМ ацетосирингону.

Для дослідів використовували рослини *N. benthamiana* віком 4–5 тижнів. Рослини вирощувались із насіння в кліматичній камері Daihan WGC-P9 (Південна Корея) за температури 25 °C з відносною вологістю повітря 75 % при 14-годинному світловому дні з питомим потоком фотосинтетично активних фотонів 200–250 мкМ/сек·м<sup>2</sup>.

Для опромінення рослин синім світлом був виготовлений освітлювач із 6-ма потужними світлодіодами (потужність кожного діода 5 Вт,  $\lambda = 440$  нм). Цей освітлювач використовувався для опромінення рослин зверху (опромінювання абаксіальних поверхонь листя). Також було виго-

товлено 6 точкових освітлювачів з одним потужним світлодіодом (потужність 5 Вт,  $\lambda = 440$  нм) для опромінення рослин знизу (опромінювання адаксіальних поверхонь листя). Обробку рослин *N. benthamiana* синім світлом проводили групами по 6 рослин одночасно як з адаксіального, так і з адаксіального боків протягом 30 хв безпосередньо перед агроінфільтрацією (6 діодів зверху та 6 діодів знизу).

Суспензію агробактерій для агроінфільтрації готували через ресуспендування отриманого центрифугуванням (5000 г, 10 хв, кімнатна температура) осаду біомаси цих бактерій у буферному розчині, що містив 10 мМ  $MgSO_4$  та 10 мМ MES (рН 5,8) [14]. Суспензію розводили буферним розчином до значення оптичної густини  $0,8 \pm 0,05$  А за довжини хвилі 600 нм. Агроінфільтрацію проводили зануренням рослин у суспензію агробактерій із подальшим вакуумуванням зануреної в суспензію рослини у вакуумній камері протягом 1 хв при  $-0,005$  МПа. Рослини інфільтрували суспензіями агробактерій, що були вирощені як за наявності ацетосирингону, так і без цього індуктора.

Після агроінфільтрації рослини культивували протягом 4-х діб у кліматичній камері Daihan (Південна Корея) за температури  $25$  °С із відносною вологістю повітря 75 % при 14-годинному світловому дні з питомим потоком фотосинтетично активних фотонів  $200-250$  мкМ/сек·м<sup>2</sup>.

Після 4-добового культивування кількість накопиченого репортерного білка в листі рослин визначали флюорометричним методом (відносно) на спектрофлюориметрі Флюорат-02-Панорама (Люмекс, РФ). Для цього з кожної рослини зрізали ті листки, в яких візуально спостерігалась флюоресценція. Листки занурювали в охолоджений на льодяній бані  $0,05$  М Tris-HCl екстракційний буферний розчин із рН 8,0 у співвідношенні 1:10 (вага:об'єм). У середньому з однієї рослини отримували 5–7 флюоресціюючих листків сумарною вагою 8–11 г. Подрібнення рослинної біомаси в екстракційному буфері відбувалось за допомогою побутового блендера протягом 2 хв на льодяній бані. Суспензії подрібненого матеріалу переносили в колби на 250 мл, закривали гумовими пробками та встановлювали для екстракції на орбітальний шейкер за температури  $2-8$  °С зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом ночі.

По закінченні екстракції з кожної колби відбирали по 1 мл суспензії та центрифугували при

$15000$  г протягом 30 хв за температури  $2-8$  °С. Для отримання проби для флюориметрії  $0,5$  мл супернатанту змішували із  $1,5$  мл буферного розчину для екстракції. Флюоресценцію вимірювали у відносних флюорометричних одиницях на довжині хвилі 510 нм при збудженні 395 нм.

Експеримент повторювали 3 рази. Кожна група рослин містила не менше 3 рослин на варіант. Статистичну достовірність відмінностей даних між групами оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента. Розрахунки проводили за допомогою MS Excel Starter.

### Результати

Для визначення впливу опромінення рослин *N. benthamiana* синім світлом безпосередньо перед агроінфільтрацією на рівень транзентного накопичення рекомбінантного репортерного білка GFP проби екстрактів рослинного матеріалу були об'єднані в такі групи:

- група А: із рослин, що були опромінені синім світлом та інфільтровані індукованими ацетосирингоном агробактеріями ( $440$  нм + Ас+);
- група В: із рослин, що не були опромінені синім світлом та інфільтровані індукованими ацетосирингоном агробактеріями ( $440$  нм – Ас+);
- група С: із рослин, що були опромінені синім світлом та інфільтровані не індукованими ацетосирингоном агробактеріями ( $440$  нм + Ас–);
- група D: із рослин, що не були опромінені синім світлом та інфільтровані не індукованими ацетосирингоном агробактеріями ( $440$  нм – Ас–);
- група А + С:  $440$  нм + Ас±;
- група В + D:  $440$  нм – Ас±;
- група А + В:  $440$  нм ± Ас+;
- група С + D:  $440$  нм ± Ас–;

Результати статистичної обробки значень вимірів флюоресценції проб екстрактів рослинного матеріалу наведено в табл. 1–3. На нашу думку, подання результатів кожного повтору окремо є більш коректним, ніж наведення таких статистичних параметрів, як стандартні відхилення або дисперсії між повторами, з огляду на те, що загальний фізіологічний стан рослин у кожному з повторів був дещо іншим і, відповідно, загальний рівень накопичення мав істотні коливання між повторами (при майже повному збереженні характеру відмінностей між означеними групами).

Таблиця 1. Порівняння накопичення репортерного білка GFP у біомасі *N. benthamiana*. Повтор № 1

Групи рослин, що порівнюються		Середнє значення флюоресценції (відносні флюорометричні одиниці)		Різниця середніх значень	$t_{розр}$ (0,95)	$t_{кр}$ (0,95)	Ефективність, %
Група 1	Група 2	Група 1	Група 2				
A (440 нм + Ac+)	B (440 нм – Ac+)	11,37	8,43	2,94	1,85	2,45	34,9
C (440 нм + Ac-)	D (440 нм – Ac-)	12,89	8,04	4,85	3,58	2,45	60,4
A + B (440 нм ± Ac+)	C + D (440 нм ± Ac-)	9,9	10,46	-0,53	0,52	2,15	-5,8
A + C (440 нм + Ac±)	B + D (440 нм – Ac±)	12,13	8,23	3,89	3,94	2,15	47,3

Таблиця 2. Порівняння накопичення репортерного білка GFP у біомасі *N. benthamiana*. Повтор № 2

Групи рослин, що порівнюються		Середнє значення флюоресценції (відносні флюорометричні одиниці)		Різниця середніх значень	$t_{розр}$ (0,95)	$t_{кр}$ (0,95)	Ефективність, %
Група 1	Група 2	Група 1	Група 2				
A (440 нм + Ac+)	B (440 нм – Ac+)	7	4,8	2,2	2,28	2,77	45,5
C (440 нм + Ac-)	D (440 нм – Ac-)	5,1	2,7	2,4	2,94	2,77	87
A + B (440 нм ± Ac+)	C + D (440 нм ± Ac-)	5,9	3,9	2	2,64	2,23	52
A + C (440 нм + Ac±)	B + D (440 нм – Ac±)	6	3,7	2,3	3,08	2,23	60,5

Таблиця 3. Порівняння накопичення репортерного білка GFP у біомасі *N. benthamiana*. Повтор № 3

Групи рослин, що порівнюються		Середнє значення флюоресценції (відносні флюорометричні одиниці)		Різниця середніх значень	$t_{розр}$ (0,95)	$t_{кр}$ (0,95)	Ефективність, %
Група 1	Група 2	Група 1	Група 2				
A (440 нм + Ac+)	B (440 нм – Ac+)	53,1	32,4	20,7	6,09	2,77	64
C (440 нм + Ac-)	D (440 нм – Ac-)	54,2	33,9	20,3	7,09	2,77	60
A + B (440 нм ± Ac+)	C + D (440 нм ± Ac-)	42,7	44,0	-1,3	0,54	2,23	-2,9
A + C (440 нм + Ac±)	B + D (440 нм – Ac±)	53,6	33,1	20,5	10,2	2,23	62

### Обговорення

Продемонстрований ефект потребує подальшої перевірки на інших рекомбінантних білках та з використанням інших промоторів. Репортерна система із використанням досить інертного у фізіологічному плані рекомбінантного GFP, експресія якого відбувається під керуванням вірусного промотора, не може надати вичерпних даних стосовно ефективності транз'єнтної експресії певного цільового білка під контролем того або іншого промотора.

Отримані результати не можуть бути прямим підтвердженням взаємозв'язку між опро-

міненням рослин синім світлом та збільшенням кількості агробактерій, що потрапили в міжклітинний простір цих рослин у результаті агроінфільтрації за допомогою вакуумування. Можливо, продемонстрований ефект також може бути наслідком того, що синій діапазон світла є фізіологічно активним відносно інших процесів життєдіяльності рослин. Так, відомо, що збільшення частки енергії світлового потоку білого світла, що припадає на синю частку фотосинтетично активного діапазону, збільшує експресію генів, які відповідають за захист рослини від несприятливих умов, та генів рослинного імунітету [15]. Кількість клітин, що

отримали Т-ДНК, залежить не тільки від кількості агробактерій у міжклітинному просторі, а й від перебігу комплексного “молекулярного діалогу” між бактеріями та рослинними клітинами. Відомо, що в цьому “діалозі” як регулятори активності *vir*-генів агробактерій, а також у процесингу та переміщенні Т-ДНК у ядро рослинної клітини задіяні певні фактори рослинної клітини, які з’являються як відповідь на наявність патогену. Тобто механізм трансферу Т-ДНК агробактерій у рослинну клітину потребує наявності певних імунних сполук самої рослинної клітини [16, 17]. Тому, можливо, ефект збільшення накопичення репортерного білка GFP у біомасі опромінених синім світлом рослин є наслідком збільшення рівня експресії потрібних для передачі Т-ДНК рослинних факторів.

Як видно із порівняння різниці середніх та співвідношення критичних і розрахованих значень критерію Стюдента для груп, що були інфільтровані індукованими та не індукованими агробактеріями, збільшення накопичення GFP у випадку штучної попередньої індукції *vir*-генів ацетосирингоном не завжди статистично підтверджується. Це узгоджується із нещодавно опублікованими результатами [1]. Також у деяких випадках застосування ацетосирингону спостерігається відносно зменшення рівня накопичення репортерного протеїну. Можливо, це пов’язано з тим, що механізм трансферу Т-ДНК у рослинну клітину жорстко пов’язаний у часі з процесами в рослинній клітині та, у випадку його передчасного штучного та часткового за-

пуску за рахунок наявності ацетосирингону в живильному середовищі, іноді починає функціонувати в неоптимальному режимі.

## Висновки

Продемонстрований ефект, на нашу думку, є достатньо цікавим у методичному плані як у лабораторній, так і у виробничій практиці, оскільки для проведення опромінювання немає потреби у високовартісному та складному апаратному забезпеченні, а тривалість самого етапу опромінювання незначна та супроводжується наднизьким споживанням електроенергії.

Продемонстровано збільшення накопичення GFP, яке коливається в межах 60–87 %, у біомасі опромінених рослин відносно накопичення цього білка в неопромінених рослинах.

Встановлення механізму, що зумовлює продемонстрований ефект, потребує подальших досліджень. Одним із найбільш досяжних варіантів, на нашу думку, є використання інших рекомбінантних бактерій, які за своєю формою були б подібними до агробактерій, що використовуються для агротрансформації, та мали б у своєму складі репортерну сполуку. Пряме вимірювання концентрації репортерної сполуки з екстрактів-лізатів інфільтрованих опромінених та неопромінених рослин продемонструвало б наявність або відсутність зв’язку між опроміненням рослини та кількістю бактерій, що може потрапити в міжклітинний простір рослин за допомогою вакуумної інфільтрації.

## Список літератури

1. *Optimization and utilization of Agrobacterium-mediated transient protein production in Nicotiana* / M. Shamloul, J. Trusa, V. Mett, V. Yusibov // *J. Visualized Experiments*. – 2014. – **86**. – P. 1–13. doi:10.3791/51204
2. *Sheludko Y.V. Agrobacterium-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants* // *Recent Patents on Biotechnology*. – 2008. – **2**, № 3. – P. 198–208.
3. *Gleba Y. Biotech development concepts: plant made pharmaceuticals* // *CBR Biotech Strategies*. – Berlin, May 20, 2014. – 46 p.
4. *Kaiser J. Is drought over for pharming?* // *Science*. – 2008. – **320**, iss. 5875. – P. 473–475. doi:10.1126/science.320.5875.473
5. *Winans S.C. Transcriptional induction of an Agrobacterium regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media* // *J. Bacteriol.* – 1990. – **172**, № 5. – P. 2433–2438.
6. *Cho H., Winans S.C. VirA and VirG activate the Ti plasmid repABC operon, elevating plasmid copy number in response to wound-released chemical signals* // *PNAS*. – 2005. – **102**, № 41. – P. 14843–14848.
7. *Simmons C.W., Vander Gheynst J.S., Upadhyaya S.K. A model of Agrobacterium tumefaciens vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent in planta transgene transient expression* // *Biotechnol. Bioeng.* – 2009. – **102**. – P. 965–970. doi:10.1002/bit.22118
8. *Melotto M., Underwood W., He S.Y. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases* // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2008. – **46**. – P. 101–122. doi:10.1146/annurev.phyto.121107.104959
9. *Kaiser H., Kappen L. In situ observations of stomatal movements in different light-dark regimes: the influence of endogenous rhythmicity and long-term adjustments* // *J. Experimental Botany*. – 1997. – **48**, № 313. – P. 1583–1589.
10. *Wang Y., Noguchi K., Terashima I. Distinct light responses of the adaxial and abaxial stomata in intact leaves of Helianthus annuus L.* // *Plant, Cell and Environment*. – 2008. – **31**. – P. 1307–1316. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01843.x

11. *Pemadasa M.A.* Movements of abaxial and adaxial stomata // *Nezv Phytol.* – 1979. – **82**. – P. 69–80.
12. *Raschke K.* Saturation kinetics of the velocity of stomatal closing in response to CO<sub>2</sub> // *Plant Physiol.* – 1972. – **49**. – P. 229–234.
13. *Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion* / M. Melotto, W. Underwood, J. Koczan et al. // *Cell.* – 2006. – **126**. – P. 969–980. doi:10.1016/j.cell.2006.06.054
14. *Systemic Agrobacterium tumefaciens* – mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants / S. Marillonnet, C. Thoeringer, R. Kandzia et al. // *Nature Biotechnology.* – 2005. – **23**, № 6. – P. 718–723. doi:10.1038/nbt1094
15. *Canopy light and plant health* / C.L. Ballare, C.A. Mazza, A. Austin, R. Pierik // *Plant Physiology.* – 2012. – **160**. – P. 145–155. doi:10.1104/pp.112.200733
16. *Biological systems of the host cell involved in Agrobacterium infection* / V. Citovsky, S.V. Kozlovsky, B. Lacroix et al. // *Cellular Microbiology.* – 2007. – **9**, № 1. – P. 9–20. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00830.x
17. *Gelvin S.B.* Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome // *Front. Plant Sci.* – 2012. – **3**. doi:10.3389/fpls.2012.00052

## References

1. M. Shamloul *et al.*, “Optimization and Utilization of *Agrobacterium*-mediated Transient Protein Production in *Nicotiana*”, *J. Visualized Experiments*, vol. 86, pp. 1–13, 2014. doi:10.3791/51204
2. Y.V. Sheludko, “*Agrobacterium*-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants”, *Recent Patents on Biotechnology*, vol. 2, no. 3, pp. 198–208, 2008.
3. Y. Gleba, “Biotech development concepts: plant made pharmaceuticals”, in *CBR Biotech. Strategies*. Berlin, Germany, May 20, 2014.
4. J. Kaiser, “Is drought over for pharming?”, *Science*, vol. 320, iss. 5875, pp. 473–475, 2008. doi:10.1126/science.320.5875.473
5. S.C. Winans, “Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media”, *J. Bacteriol.*, vol. 172, no. 5, pp. 2433–2438, 1990.
6. H. Cho and S.C. Winans, “VirA and VirG activate the Ti plasmid repABC operon, elevating plasmid copy number in response to wound-released chemical signals”, *PNAS*, vol. 102, no. 41, pp. 14843–14848, 2005.
7. C.W. Simmons *et al.*, “A model of *Agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent in planta transgene transient expression”, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 102, pp. 965–970, 2009. doi:10.1002/bit.22118
8. M. Melotto *et al.*, “Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases”, *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 46, pp. 101–122, 2008. doi:10.1146/annurev.phyto.121107.104959
9. H. Kaiser and L. Kappen, “In situ observations of stomatal movements in different light-dark regimes: the influence of endogenous rhythmicity and long-term adjustments”, *J. Experimental Botany*, vol. 48, no. 313, pp. 1583–1589, 1997.
10. Y. Wang *et al.*, “Distinct light responses of the adaxial and abaxial stomata in intact leaves of *Helianthus annuus* L.”, *Plant, Cell and Environment*, vol. 31, pp. 1307–1316, 2008. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01843
11. M.A. Pemadasa, “Movements of abaxial and adaxial stomata”, *Nezv Phytol.*, vol. 82, pp. 69–80, 1979.
12. K. Raschke, “Saturation kinetics of the velocity of stomatal closing in response to CO<sub>2</sub>”, *Plant Physiol.*, vol. 49, pp. 229–234, 1972.
13. M. Melotto *et al.*, “Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion”, *Cell*, vol. 126, pp. 969–980, 2006. doi:10.1016/j.cell.2006.06.054
14. S. Marillonnet *et al.*, “Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants”, *Nature Biotechnology*, vol. 23, no. 6, pp. 718–723, 2005. doi:10.1038/nbt1094
15. C.L. Ballare *et al.*, “Canopy light and plant health”, *Plant Physiology*, vol. 160, pp. 145–155, 2012. doi:10.1104/pp.112.200733
16. V. Citovsky *et al.*, “Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection”, *Cellular Microbiology*, vol. 9, no. 1, pp. 9–20, 2007. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00830.x
17. S.B. Gelvin, “Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome”, *Front. Plant Sci.*, vol. 3, 2012. doi:10.3389/fpls.2012.00052

А.А. Петерсон, М.Ю. Василенко, Ю.С. Прищеп, Л.Б. Орябінська, М.В. Кучук

ВПЛИВ ОПРОМІНЮВАННЯ СВІТЛОМ СИНЬОГО ДІАПАЗОНУ СПЕКТРА НА ПІДВИЩЕННЯ РІВНЯ ТРАНЗІЄНТНОГО НАКОПИЧЕННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО РЕПОРТЕРНОГО БІЛКА GFP У РОСЛИНАХ *NICOTIANA BENTHAMIANA*

**Проблематика.** Рослинні експресійні системи набувають все більш широкого застосування у науковій та комерційній біотехнології. Дослідження впливу різних факторів на ефективність рослинних транзійнтних експресійних систем розширює наукове підґрунтя для масштабного та економічно обґрунтованого використання цих систем у біотехнологічному виробництві.

**Мета дослідження.** Визначення впливу опромінення рослин *Nicotiana benthamiana* синім світлом безпосередньо перед агроінфільтрацією на рівень транзійнтного накопичення рекомбінантного репортерного білка GFP.

**Методика реалізації.** Опромінення рослин синім світлом здійснювали світлодіодними освітлювачами ( $\lambda = 440$  нм). Кількість накопиченого репортерного білка в листі рослин визначали флюорометричним методом.

**Результати дослідження.** Продемонстровано збільшення накопичення GFP у біомасі опромінених рослин відносно накопичення цього білка в неопромінених рослинах. Збільшення рівня накопичення коливається в межах 60–87 % залежно від інших умов агроінфільтрації.

**Висновки.** Продемонстрований ефект є перспективним у методичному плані як у лабораторній, так і у виробничій практиці з огляду на те, що апаратне забезпечення для опромінювання є конструктивно простим, дешевим, має наднизьке споживання електроенергії, а саме опромінювання відбувається протягом короткого часу.

**Ключові слова:** рослинна експресійна система; транзйентна експресія; *Nicotiana benthamiana*; рекомбінантний білок; зелений флуоресцюючий протеїн; GFP.

А.А. Петерсон, М.Ю. Василенко, Ю.С. Прищеп, Л.Б. Орябинская, М.В. Кучук

#### ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ СВЕТОМ СИНЕГО ДИАПАЗОНА СПЕКТРА НА ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ТРАНЗИЕНТНОГО НАКОПЛЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕПОРТЕРНОГО БЕЛКА GFP В РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA BENTHAMIANA*

**Проблематика.** Растительные экспрессионные системы все шире используются в научной и коммерческой биотехнологии. Исследование влияния различных факторов на эффективность растительных транзйентных экспрессионных систем расширяет научный базис для масштабного и экономически обоснованного использования этих систем в биотехнологическом производстве.

**Цель исследования.** Определение влияния облучения растений *Nicotiana benthamiana* синим светом непосредственно перед агроинфильтрацией на уровень транзйентного накопления рекомбінантного репортерного белка GFP.

**Методика реализации.** Облучение растений синим светом осуществлялось светодиодными светильниками ( $\lambda = 440$  нм). Количество накопленного репортерного белка в листьях растений определяли флуорометрическим методом.

**Результаты исследования.** Продемонстрировано увеличение накопления GFP в биомассе облученных растений по отношению к накоплению этого белка в необлученных растениях. Увеличение уровня накопления находилось в пределах 60–87 % в зависимости от других условий агроинфильтрации.

**Выводы.** Продемонстрированный эффект выглядит перспективным в методическом плане как в лабораторной, так и в производственной практике в связи с тем, что аппаратное обеспечение для облучения является конструктивно простым, дешевым и энергоэффективным, а само облучение осуществляется на протяжении короткого времени.

**Ключевые слова:** растительная экспрессионная система; транзйентная экспрессия; *Nicotiana benthamiana*; рекомбінантний білок; зелений флуоресцируючий протеїн; GFP.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції  
07 березня 2016 року