

ВАРЧЕНКО О. І.^{1,2✉}, ДЗУГ М. С.^{2,3}, ПАРІЙ М. Ф.^{2,3}, СИМОНЕНКО Ю. В.^{1,2}¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: okvarchenko@gmail.com² Всеукраїнський науковий інститут селекції (ВНІС),
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 30, e-mail: biotechvnis@gmail.com³ Національний університет біоресурсів та природокористування НААН України,
Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15

✉ okvarchenko@gmail.com, (063)-201-52-40

ВПЛИВ БІЛКА-СУПРЕСОРА ПОСТТРАНСКРИПЦІЙНОГО САЙЛЕНСИНГУ P19 НА РІВЕНЬ ТРАНЗІЄНТНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА *GFP* В РОСЛИНАХ МАХОРКИ *NICOTIANA RUSTICA* L.

Мета. Створення генетичних конструкцій для вивчення впливу вірусного білка-супресора посттранскрипційного сайленсингу генів P19 на транзійтну експресію та накопичення репортерного зеленого флуоресцентного білка GFP. **Методи.** Для створення генетичних конструкцій використовували метод молекулярного клонування *Golden Gate*; листкові тканини рослин махорки *Nicotiana rustica* L. інфільтрували суспензією *Agrobacterium tumefaciens* L.; рівень експресії гена *gfp* визначали за допомогою спектрофлуориметричного та кількісного білкового (метод Бредфорда) аналізів. **Результати.** В результаті роботи створено генетичну конструкцію pSPV2324, яка містила репортерний ген зеленого флуоресцентного білка *gfp* та ген синтезу вірусного білка-супресора посттранскрипційного сайсенсингу *p19*, та визначено їх вплив на накопичення рекомбінантного білка GFP. Порівняльний аналіз рівня експресії гена *gfp* без та з геном синтезу білка-супресора в генетичному векторі показав, що рівень флуоресценції білка GFP в тканинах махорки за спектрофлуориметричним аналізом був в 1,3 раза вищий за використання конструкції з геном супресора *p19*. **Висновки.** Вперше доведено позитивний ефект впливу вірусного супресора сайленсингу генів P19 на накопичення рекомбінантного білка GFP у рослин махорки *N. rustica* L. Збільшення рівня флуоресценції білка GFP за використання конструкції з геном білка-супресора *p19* за спектрофлуориметричним аналізом збігається зі збільшенням сумарної концентрації загальних водорозчинних білків та рівнем флуоресценції білка GFP за їх нативного електрофоретичного розділення.

Ключові слова: клонування, генетичні конструкції, транзійтна експресія, білок-

супресор сайленсингу P19, зелений флуоресцентний білок (GFP).

Для продукції гетерологічних рекомбінантних білків найчастіше використовують мікроорганізми, клітинні культури або тварини. Але одним із перспективних шляхів їх отримання є використання рослинних експресійних систем для накопичення цінних рекомбінантних білків [1–4]. Тому розробка методів їх гетерологічної експресії в рослинах залишається дуже актуальною. Рослинні системи мають ряд переваг, серед яких економічність, необмежене джерело рослин, можливість вживання у їжу, стабільність білків, можливість глікозилування та відсутність бактеріальних патогенів і токсинів. Як продуценти білків можна використовувати трансгенні рослини, але стабільна ядерна експресія дозволяє накопичити тільки до 5 % рекомбінантного білка [5]. Інший підхід базується на транзійтній експресії перенесених генів без їх стабільної інтеграції в геном [1–4]. Вона здійснюється шляхом *Agrobacterium*-опосередкованого введення плазмідних векторів у клітини без їх інтеграції в геном. Експресія введеного гена відбувається протягом певного часу (від 3 до 7 днів), після чого вона швидко знижується, а в подальшому чужорідна ДНК елімінується. Перевагами транзійтної експресії, крім швидкого накопичення рекомбінантного білка, є висока ефективність (дозволяє накопичити до 50 % білка), та, на відміну від трансгенних рослин, вона не має позиційного хромосомного ефекту вбудовування трансгена [5]. Безперечно, що система транзійтної експресії в рослинах у більшості випадків економічно-вигідна технологія, яка вже почала застосовуватися в промислових масштабах.

© ВАРЧЕНКО О. І., ДЗУГ М. С., ПАРІЙ М. Ф., СИМОНЕНКО Ю. В.

Одним із обмежувальних факторів, який впливає на рівень експресії перенесених генів, є посттранскрипційне замовчування генів (posttranscriptional gene silencing, PTGS) [6]. Процес посттранскрипційної регуляції експресії генів, що ґрунтується на специфічному впізнаванні і деградації рибонуклеїнової кислоти (РНК), є природним захисним механізмом у рослин проти вірусів [7], хоча багато вірусів еволюційно здобули можливість долати механізми захисту. Це загальна реакція рослин, яка обмежує ефективність транзійтної експресії, що опосередковується агробактеріями [8]. Найефективнішим супресором РНК-інтерференції вважають білок р19, який було виділено з вірусу куцистої карликовості томатів (Tomato bushy stunt virus, TBSV) [9]. Було з'ясовано, що ко-експресія цього вірусного супресора сайленсингу зменшує відповідь рослин дикого типу *Nicotiana benthamiana* і спричиняє уповільнення замовчування генів за транзійтної експресії, що в результаті призводило до різкого підвищення накопичення широкого спектра білків. Більше того, ефект супресора р19 не був інтенсивним у клітинах, які отримали до чотирьох окремих Т-ДНК, і проявлявся лише до старіння листків [9]. Ці дані свідчать, що транзійтна експресія в присутності супресорів замовчування експресії генів може мати значення не тільки як інструмент дослідження функціональної характеристики білків, але й в промисловому виробництві.

Серед видів роду *Nicotiana* модельним видом є *N. benthamiana* Domin, який найчастіше використовують у дослідженнях із транзійтної експресії генів у рослин [1–4]. Дослідники також намагаються долучити й інші види, зокрема такі, як *N. excelsior* J.M. Black, *N. tabacum* L., *N. ×excelsiana* тощо (особливо під час використання вакуумної інфільтрації рослин) [10, 11]. Наступним видом після *N. benthamiana* щодо використання є тютюн *N. tabacum* L. – важлива сільськогосподарська культура, яка також характеризується досить високим рівнем накопичення рекомбінантних білків [12].

Махорка (*N. rustica* L.) порівняно з іншими видами роду *Nicotiana*, має великий потенціал експресії гетерологічних білків, велику вегетативну біомасу, легко інфільтрується (як за вакуумної інфільтрації, так і за допомогою шприца) і при цьому є невибагливою у вирощуванні. Тому вона є перспективним видом-хазяїном для накопичення цінних рекомбінантних білків.

Матеріали і методи

Генетичні конструкції створювали за допомогою методу модульного молекулярного клонування Golden Gate (MoClo) [13]. В роботі було використано репортерний ген *gfp*, виділений з *A. victoria*, що кодує зелений флуоресцентний білок (Green Fluorescent Protein, GFP) [14]. Для дослідження впливу білка-супресора сайленсингу Р19 на експресію гена *gfp* використовували дві генетичні конструкції (рис. 1): 1) рSPV2313 (раніше створена нами), яка містила кодуючу послідовність гена *gfp* за контролю подвійного 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV (Cauliflower Mosaic Virus), 5' послідовностей, що не транслюється, гена 2B сімейства генів малої субодиниці рибулозобісфосфаткарбоксілази (Rubisco) (5'UTR RbcS2b) з Різушки Таля (*A. thaliana* (L.) Heynh.) і термінаторну послідовність транскрипта 7 гена *A. tumefaciens* разом із сигналом поліаденюлювання та 3'-послідовністю, що не транслюється (Atug7); 2) рSPV2324, яка містила дві транскрипційні одиниці: перша – містила Т-ДНК конструкції рSPV2313, а друга складалася з таких елементів: 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV, 5'UTR з вірусу мозаїки тютюну (Tobacco mosaic virus, TMV), послідовності гена *P19* та термінаторної послідовності разом із сигналом поліаденюлювання та 3'-послідовністю, що не транслюється, гена *ocs* октопінсинтази з *A. tumefaciens* (рис. 1).

Базові генетичні модулі були люб'язно надані Dr. Nicola Patron з MoClo Plant Parts Kit (Addgene kit # 1000000047) та Dr. Sylvestre Marillonnet з MoClo Toolkit (Addgene kit # 1000000044)" [15–17]. Клонування (збірку) всіх модульних елементів у вектори-акцептори L1 та L2 рівня проводили відповідно до статті Weber et al. (2011).

Усі елементи клонували у вектор для збірки першого рівня L1, що містить ген *lacZ*, який кодує фермент β-галактозидазу, що розщеплює дисахарид лактозу на глюкозу та галактозу, для біло-голубого скринінгу бактерій. Для збірки кінцевої конструкції проводили клонування транскрипційних одиниць у вектор другого рівня L2 за стандартною методикою із Cred селекцією [15]. Таким чином, конструкції відрізнялися наявністю транскрипційної одиниці із геном синтезу білка-супресора *p19*.

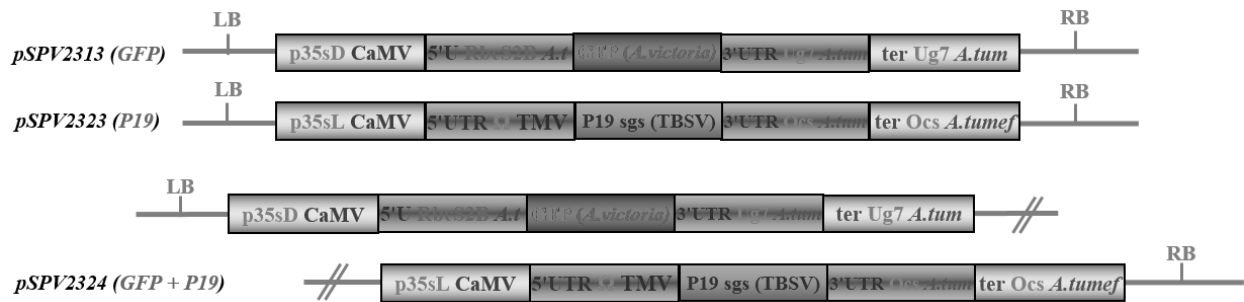


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК створених генетичних конструкцій.

Продукти клонування трансформували в компетентні клітини *Escherichia coli* штаму XL-blue [18]. Для відбору колоній з імовірно правильно сконованими елементами використовували біло-голубий скринінг [19], колонії відбирали за додавання 100 mg/L ампіциліну для векторів першого рівня та 100 mg/L канаміцину для векторів другого рівня. Відібрані колонії після скринінгу нарощували, виділяли плазмідну ДНК за допомогою NID буфера [20], проводили рестрикційний та ПЛР аналіз. Продукти рестрикції та ампліфікації розділяли в агарозному гелі [21]. Комп'ютерне моделювання *in silico* проводили в програмі SerialCloner. Для рестрикційного аналізу використовували рестриктази FastDigestTM: *Bgl* II. ПЛР аналіз проводили для виявлення гена *gfp* в генетичних векторах (розмір продукту ампліфікації 717 bp); для цього використовували специфічні праймери: F: GTG AGC AAG GGC GAG GA; R: TTA CTT GTA CAG CTC GTC. Перевіреними плазмідами трансформували компетентні клітини *Agrobacterium tumefaciens*, штам GV3101 – методом freeze/thaw [22]. Далі на отриманих колоніях проводили ПЛР аналіз із праймерами до гена *gfp*.

У роботі використовували рослини махорки *Nicotiana rustica* L., які вирощували в умовах теплиці за 25/18°С та 16/8 годинного фотоперіоду (день/ніч відповідно). Насіння махорки було люб'язно надано к. б. н. Белокуровою В. Б. з Колекції зародкової плазми рослин флори України та світової флори (ІКБГІ НАН України). Для вивчення впливу білка-супресора сайленсингу генів P19 на експресію гена *gfp* рослини махорки *N.rustica* L. трансформували транз'єнтно. Для цього нічну культуру агробактерій дорощували до оптичної щільності суспензії, що дорівнювала одиниці, та ресуспендували у буфері для інфільтрації (10 мМ MgSO₄, рН 5,6–5,8) з кінцевою оптичною щільністю OD₆₀₀ = 1. Інфільтрацію рослин проводили за допомогою шприца [23]. Експресію гена *gfp* детектували на

7 день після інфільтрації візуально та проводили спектрофлуориметричний аналіз на флуоресцентному спектрофлуориметрі «Флюорат-02-Панорама» (збудження за довжини хвилі 395 нм, емісія за 509 нм).

Водорозчинні білки виділяли в буфері для екстракції (PBS), що складався з таких елементів: 80 мМ Na₂HPO₄, 20 мМ NaH₂PO₄ та 100 мМ NaCl, рН 7–7,5 [21]. Тканини рослин махорки *N. rustica* L., у яких детектували експресію гена *gfp*, розтирали з буфером для екстракції в попередньо охолодженій ступці (+4°С) в концентрації 3:1 (300 мкл буфера на 100 мг тканини), після чого суспензію осаджували (+4°С, 14000 грм, 30 хвилин). Надосад використовували для визначення сумарної кількісної концентрації білків за Бредфордом [24], розділення білків здійснювали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі.

Результати та обговорення

Усі генетичні конструкції було створено за допомогою методу модульного молекулярного клонування *Golden Gate* (MoClo), що ґрунтується на використанні рестриктаз IIS типу та T4 ДНК-лігази [13, 15]. Для збирання транскрипційних одиниць L1 рівня використовували стандартизовані генетичні модулі L0 рівня. Кілька транскрипційних одиниць з векторів L1 рівня потім бути клоновані в кінцевий вектор L2 рівня.

Спочатку була сконована проміжна конструкція pSPV2323, яка містила послідовність гена *p19* за контролю 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV, 5'UTR з вірусу тютюнової мозаїки (TMV) та термінатора гена *ocs* октопінсинтази з *A. tumefaciens*. На другому етапі дві транскрипційні одиниці (pSPV2313 та pSPV2323) були зібрані в кінцевий вектор pSPV2324 (рис. 1). Таким чином, у результаті роботи було створено генетичну конструкцію pSPV2324, що містить гени синте-

зу *gfp* та білка-супресора *p19*. Створену конструкцію перевіряли ПЛР та рестрикційним аналізом, який підтвердив правильність збірки всіх фрагментів (рис. 2). Довжини фрагментів рестрикції та продуктів ампліфікації збігалися із очікуваними *in silico*. Перевіреною плазмідною трансформували компетентні клітини *Agrobacterium tumefaciens*, штам GV3101.

Далі проводили транз'єнтну генетичну трансформацію листків рослин махорки *N. rustica* L. суспензією агробактерій. Махорка є одним із модельних видів роду *Nicotiana*, серед видів якого для експериментів за транз'єнтною експресією генів найчастіше використовують *N. benthamiana* Domin [1–4]. На 7 день після інфільтрації було проведено візуальний та спектрофлуориметричний аналіз експресії гена *gfp*, який показав істотне збільшення (табл. 1) рівня експресії за використання в генетичному векторі гена синтезу білка-супресора *p19*.

Водночас сумарна концентрація загальних водорозчинних білків (табл. 1) також підвищувалася в 1,2 раза за використання в конструкції супресора сайленсингу *p19*, а електрофоретичне розділення білків в ПААГ в нативних умовах

теж показало збільшення флуоресценції білка GFP в екстрактах тканин, інфільтрованих конструкцією pSPV2324 (рис. 3). Це свідчить про позитивний ефект використання білка супресора сайленсингу P19 на накопичення гетерологічних білків, а саме рекомбінантного білка GFP.

Використання рослинних систем є перспективним шляхом для отримання рекомбінантних білків. Але актуальним завданням для дослідників залишається пошук факторів, які могли б підвищити вміст рекомбінантних білків за транз'єнтної експресії. Voinnet O. зі спів. (2003) у своїй роботі з'ясували, що експресія перенесених генів, опосередкована *Agrobacterium*, обмежена постраскрипційним замовчуванням генів (PTGS), а також те, що обмеження може бути подолане за використання вірусних білків-супресорів. Одним із найбільш ефективних супресорів постраскрипційного сайленсингу генів у рослинах вважається білок p19 вірусу куцистої карликовості томату. Ефективність дії цього супресора характерна для трансгенів, що знаходилися за контролю 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти [9].

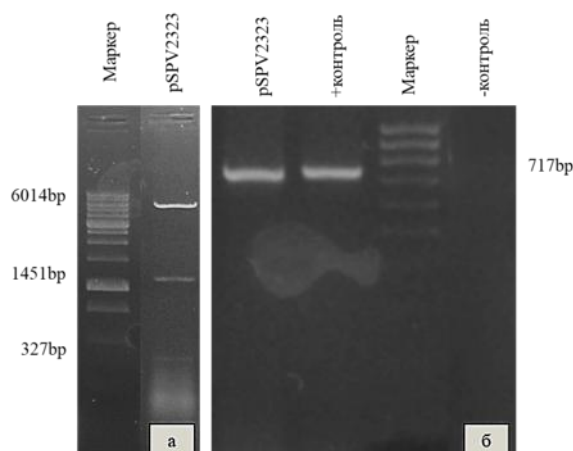


Рис. 2. Електрофореграми розділення продуктів рестрикції та ампліфікації плазмідної ДНК створеної конструкції pSPV2324: а) рестрикційний аналіз (рестриктаза FastDigest™: Bgl II); б) ПЛР аналіз зі специфічними праймерами до гена *gfp*.

Таблиця 1. Аналіз рівня флуоресценції білка GFP та визначення сумарної концентрації загальних водорозчинних білків у інфільтрованих тканинах махорки *N. rustica*

	Конструкція	Середній показник рівня флуоресценції	Середній показник концентрації загальних водорозчинних білків
1	pSPV2313	1,68±0,08	2621±2,54
2	pSPV2324	2,20±0,10	3145±4,25
3	К GV3101	0,08±0,01	568±3,22
4	К тканини листка	0,06±0,02	570±5,25

Примітки: К GV3101 – інфільтровані тканини листка махорки пустим штамом *Agrobacterium tumefaciens* GV3101; К – тканини листа – неінфільтровані тканини листка махорки.

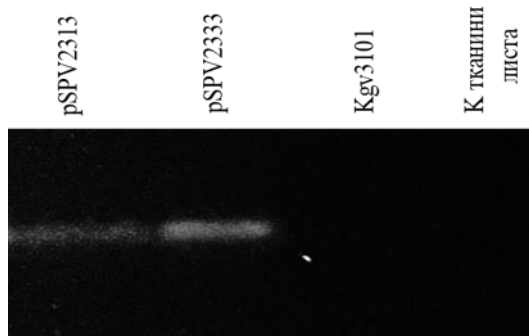


Рис. 3. Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі в неденатуруючих умовах (детекція білка GFP в ультрафіолетовому світлі): pSPV2313, pSPV2324 – білкові екстракти з листових тканин махорки *N.rustica*, в яких транзійтно експресували ген *gfp*; K GV3101 та K – тканини листа – екстракти контрольних рослин махорки, інфільтрованих пустим штамом *A. tumefaciens* GV3101, та неінфільтрованих відповідно.

Це також підтверджується в наших дослідженнях, де спектрофлуориметричний аналіз засвідчив збільшення рівня флуоресценції інфільтрованих тканин махорки в 1,3 раза за використання конструкції pSPV2324, що містить ген синтезу білка-супресора PTGS *p19*, порівняно з використанням конструкції pSPV2313, де не було гена супресора. Таке збільшення експресії гетерологічних генів прослідковується і на інших видах роду *Nicotiana*, наприклад, *N. benthamiana* Domin [25, 26] та *N. tabacum* L. [26]. Крім цього, ми вперше показали можливість підсилення експресії введеного гена шляхом одночасного введення супресора сайленсингу чужорідних генів на прикладі збільшення експресії гена *gfp* за використання гена білка-супресора *p19* у махорки *N. rustica* L., що є перспективним хазяїном для транзійтної експресії гетерологічних генів.

Висновки

У результаті роботи створено генетичну конструкцію pSPV2324, яка містила репортерний ген зеленого флуоресцентного білка *gfp* та ген синтезу білка-супресора посттранскрипційного сайленсингу *p19* та встановлено позитивний вплив вірусного супресора сайленсингу генів P19 на накопичення рекомбінантного білка

GFP. Порівняльний аналіз рівня експресії гена *gfp* без та з геном синтезу білка-супресора в генетичному векторі показав, що рівень флуоресценції білка GFP в тканинах махорки за спектрофлуориметричним аналізом був в 1,3 раза вищий за використання конструкції з геном супресора *p19*, а сумарна концентрація загальних водорозчинних білків збільшувалася у 1,2 раза. Під час електрофоретичного розділення білків у неденатуруючих умовах спостерігалось аналогічне збільшення флуоресценції нативного білка GFP в екстрактах тканин, інфільтрованих конструкцією pSPV2324 порівняно з pSPV2313. При цьому нами вперше доведено позитивний ефект впливу гена білка-супресора *p19* на збільшення рівня експресії гена *gfp* у рослин махорки *N. rustica* L. Отримані дані можуть бути використані для підвищення рівня накопичення інших цінних фармацевтичних рекомбінантних білків та швидкого отримання їх значної кількості.

Робота виконувалася в рамках наукових проєктів ІКБГ НАН України: III-5-16 «Розробка біотехнологій отримання природних та гетерологічних сполук в рослинних системах» та 1230/3 «Вивчення впливу стресових факторів біотичного і абіотичного походження на накопичення вторинних метаболітів та рекомбінантних сполук в генетично змінених та нативних рослинних системах».

References

1. Kapila J., de Rycke R., van Montagu M., Angenon G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.*, 1997, Vol. 122, № 1. P. 101–108. doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04541-4.
2. Fischer R., Vaquero-Martin C., Sack M., Drossard J., Emans N. Commandeur U. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999. Vol. 30, № 2. P. 113–116. doi.org/10.1111/j.1470-8744.1999.tb00900.x.
3. Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol.* 2005. Vol. 23, № 6. P. 718–723. doi: 10.1038/nbt1094.
4. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine.* 2005. Vol. 23, № 17-18. P. 2042–2048. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.01.006.

5. Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 2000, Vol. 18. P. 1151–1155. doi.org/10.1038/81132.
6. Johansen L.K., Carrington J.C. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 2001, Vol. 126, № 3. P. 930–938. doi: 10.1104/pp.126.3.930.
7. Malinovskiy V.I., Borovskiy G.B., Gorbyleva E.L., Fedoseeva I.V., Tauson, E.L., Sokolov V.A., Voynikov V.K. Rol' korotkikh RNK v ustoychivosti rasteniy k bioticheskim i abioticheskim stressam. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii.* 2013, Vol. 17, № 1. P. 96–103. [in Russian] / Малиновский В.И., Боровский Г.Б., Горбылева Е.Л., Федосеева И.В., Таусон Е.Л., Соколов В.А., Войников В.К. Роль коротких РНК в устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2013. Т. 17. № 1. С. 96–103.
8. Kirgizova I.V., Ergaliev T.M. Kharakteristika belka-supressora R19 virusa Tomato bushy stunt virus. *Scientific Cooperation Center "Interactive plus"*. 2017. P. 1–6. [in Russian] / Киргизова И.В., Ергалиев Т.М. Характеристика белка-супрессора р19 вируса Tomato bushy stunt virus. *Scientific Cooperation Center "Interactive plus"*. 2017. С. 1–6.
9. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal.* 2003. Vol. 33, № 5. P. 949–956. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x.
10. Leuzinger K., Dent M., Hurtado J., Stahnke J., Lai H., Zhou X., Chen Q. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2013. Vol. 77. P. e50521. doi: 10.3791/50521.
11. Shamloul M., Trusa J., Mett V., Yusibov, V. Optimization and utilization of *Agrobacterium*-mediated transient protein production in *Nicotiana*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2014. Vol. 86, P. e51204. doi: 10.3791/51204.
12. Conley A.J., Zhu H., Le L.C., Jevnikar A.M., Lee B.H., Brandle J.E., Menassa R. Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. *Plant biotechnology journal.* 2011. Vol. 9, № 4. P. 434–444. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00563.x.
13. Engler C., Gruetzner R., Kandzia R., Marillonnet S. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS one.* 2009. Vol. 4, № 5. P. 5553. doi.org/10.1371/journal.pone.0005553.
14. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher, D.C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science.* 1994. Vol. 263. P. 802–805. doi: 10.1126/science.830329.
15. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 2. P. e16765. doi: 10.1371/journal.pone.0016765.
16. Engler C., Youles M., Gruetzner R., Ehnert T.-M., Werner S., Jones J.D., Patron N.J., Marillonnet S. A golden gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synthetic Biology.* 2014. Vol. 3, № 11. P. 839–843. doi: 10.1021/sb4001504.
17. Werner S, Engler C, Weber E, Gruetzner R, Marillonnet S. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioeng Bugs.* 2012. Vol. 3, № 1. P. 38–43. doi: 10.1371/journal.pone.0016765.
18. Froger A., Hall J.E. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments: JoVE.* 2007. Vol. 6, P. e253. doi: 10.3791/253.
19. Lerner C.G., Inouye, M. Low copy number plasmids for regulated low-level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability. *Nucleic acids research.* 1990. Vol. 18, № 15. P. 4631. doi: 10.1093/nar/18.15.4631.
20. Lezin G., Kosaka Y., Yost H.J., Kuehn, M.R., Brunelli, L. A one-step miniprep for the isolation of plasmid DNA and lambda phage particles. *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 8. P. e23457. doi: 10.1371/journal.pone.0023457.
21. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 545 p.
22. Varchenko O.I., Krasnyuk B.M., Fedchunov O.O., Zimina O.V., Parii M.F., Symonenko Yu.V. Genetic constructs creating using Golden Gate method. *Factors in experimental evolution of organisms.* 2019. Vol. 25. P. 190–196. [in Ukrainian] / Варченко О.І., Красюк Б.М., Федчунов О.О., Зіміна О.В., Парій М.Ф., Симоненко Ю.В. Створення генетичних конструкцій за допомогою методу клонування Golden Gate. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2019. Т. 25. С. 190–196. doi.org/10.7124/FEEO.v25.1163.
23. Leuzinger K., Dent M., Hurtado J., Stahnke J., Lai H., Zhou X., Chen Q. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2013. Vol. 77. e50521. P. 1–9. doi: 10.3791/50521.
24. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72, P. 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
25. Liu L., Zhang Y., Tang S., Zhao Q., Zhang Z., Zhang H., Xie Q. An efficient system to detect protein ubiquitination by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal.* 2010. Vol. 61, № 5. P. 893–903. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04109.x
26. Siddiqui S.A., Sarmiento C., Truve E., Lehto H., Lehto K. Phenotypes and functional effects caused by various viral RNA silencing suppressors in transgenic *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum*. *Molecular plant-microbe interactions.* 2008. Vol. 21, № 2. P. 178–187. doi: 10.1094/MPMI-21-2-0178.

VARCHENKO O.I.^{1,2}, DZUH M.S.^{2,3}, PARIJ M.F.^{2,3}, SYMONENKO Yu.V.^{1,2}

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: okvarchenko@gmail.com

² Ukrainian Scientific Institute of Plant Breeding (VNIS), Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 30, e-mail: biotechvnis@gmail.com

³ National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukraine, 03041, Kyiv, Heroiv Oborony str., 15

THE INFLUENCE OF POSTTRANSCRIPTION SILENCING PROTEIN-SUPPRESSOR P19 ON THE TRANSIENT *GFP* GENE EXPRESSION LEVEL IN AZTEC TOBACCO PLANTS (*NICOTIANA RUSTICA* L.)

Aim. Genetic constructs creation for studying the influence effect of the viral posttranscriptional silencing protein suppressor p19 on transient reporter green fluorescent protein (GFP) expression and accumulation. **Methods.** The Golden Gate molecular cloning method was used to create the genetic constructs; the leafy tissues of the Aztec tobacco plants (*Nicotiana rustica* L.) were infiltrated with a suspension of *Agrobacterium tumefaciens* L.; the *gfp* gene expression level was determined by spectrofluorometric and quantitative protein (*Bradford method*) assays. **Results.** As a result of the work, the pSPV2324 genetic construct was created, which contained the reporter gene for the green fluorescent protein *gfp* and the gene for the synthesis of the viral posttranscriptional silencing protein suppressor p19 and its effect on the accumulation of the recombinant GFP protein was determined. A comparative analysis of the *gfp* gene expression level without and with the suppressor protein synthesis gene in the genetic vector showed that the fluorescence level of GFP protein in Aztec tobacco tissues was 1.3 times higher during spectrofluorimetric analysis using the p19 suppressor gene construct. **Conclusions.** The positive effect of the viral suppressor silencing P19 gene on the accumulation of recombinant GFP protein in tissues plants of *N. rustica* L. was shown for the first time. The increase in GFP protein fluorescence when using the p19 suppressor protein construct in spectrofluorimetric analysis coincides with an increase in the total concentration of total water-soluble proteins and the level fluorescence of GFP protein in their native electrophoretic separation.

Keywords: cloning, genetic constructs, transient expression, silencing protein suppressor p19, green fluorescent protein (GFP).