

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 578.2: 577.2: 632.3

На правах рукописи

ГРИЦЕНКО ДИЛЯРА АЛЕКСАНДРОВНА

Создание вирусного вектора для получения рекомбинантных белков в растениях и исследование эффективности их экспрессии

6D060700-Биология

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты:
Галиакпаров Н.Н, PhD;
Munir Mawassi, PhD,
директор департамента
вирусологии, Волкани центр

Республика Казахстан

Алматы, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Вирусы растений.....	12
1.1.1 Строение вирусной частицы	14
1.1.2 Строение генома вирусов.....	17
1.1.2.1 РНК вирусы с геномом позитивной полярности.....	18
1.2 Вирусы винограда.....	21
1.2.1 Вирус А винограда.....	23
1.3 Распространение вируса А винограда. Естественные переносчики вируса в природе.....	26
1.4 Размножение вируса А винограда в клетках растений. Репликация и экспрессия генома.....	27
1.5 Передвижение вируса А винограда по растению.....	29
1.6 Научное и практическое применение вирусов растений.....	33
1.6.1 Генетическая инженерия вирусных векторов.....	34
1.6.1.1 Вирусные вектора первого поколения.....	35
1.6.1.2 Вирусные вектора второго поколения	37
1.6.2 Методы создания векторов для мультигенной экспрессии.....	38
1.6.2.1 Участки внутренней посадки рибосом.....	39
1.6.2.2 2А пептиды.....	40
1.6.3 Вирусные вектора в производстве рекомбинантных белков в растениях.....	41
1.6.3.1 Комплексная технология получения рекомбинантных белков в растениях.....	45
1.6.4 Вирусные вектора для производства комплексных белков.....	46
1.6.5 Вектора для индуцированного замалчивания генов растений.....	48
1.6.6 Вирусные вектора для представления эпитопов антигенов, производство вакцин.....	52
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
2.1 Материалы.....	55
2.2 Методы.....	58
2.2.1 Филогенетический анализ Вируса А винограда.....	64
2.2.2 Стратегия создания вирусного вектора на основе полного генома вируса А винограда.....	65
2.2.2.1 Дизайн праймеров для сайт - направленного мутагенеза генома ВАВ и синтеза последовательностей 2А пептидов.....	66
2.2.2.2 Удаление первых ОРС и внесение рестрикционных сайтов между ОРС4 и ОРС5 генома ВАВ	68
2.2.2.3 Клонирование и секвенирование последовательностей 2А пептидов. Разработка Т - вектора	69
2.2.2.4 Клонирование и секвенирование гетерологичного гена	73
2.2.2.5 Клонирование и секвенирование кассеты, несущей	

	гетерологичный ген и 2А последовательности	74
2.2.2.6	Сборка модифицированного генома в промежуточном векторе....	75
2.2.2.7	Субклонирование немодифицированного генома ВАВ в бинарный вектор.....	76
2.2.2.8	Сборка модифицированного генома ВАВ в бинарном векторе....	77
2.2.3	Разработка вектора путем деконструирования генома ВАВ. Замена ОРС4 на гетерологичный ген	78
2.2.3.1	Дизайн праймеров для сайт - направленного мутагенеза генома ВАВ. Удаление ОРС4.....	79
2.2.3.2	Субклонирование кассеты, несущей гетерологичный ген и 2А последовательности.....	80
2.2.3.3	Сборка модифицированного генома в бинарном векторе	81
2.2.4	Разработка трансгенных растений <i>Nicotiana benthamiana</i> , несущих ген капсидного белка ВАВ	82
2.2.4.1	Трансформация растений путем использования агробактерий.....	83
2.2.4.2	Проверка семян на наличие трансгена.....	85
2.2.5	Трансформация агробактерий разработанными векторами	85
2.2.6	Агробактериальная инфильтрация листьев <i>Nicotiana benthamiana</i>	86
2.2.7	Анализ РНК и белков из зараженных и системных листьев табака	86
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	90
3.1	Филогенетический анализ Вируса А винограда.....	90
3.2	Разработка вирусного вектора на основе полного генома ВАВ.....	94
3.2.1	Удаление первых ОРС и внесение рестрикционных сайтов между ОРС4 и ОРС5.....	96
3.2.2	Клонирование и субклонирование 2А последовательностей и гетерологичного гена между ними.....	97
3.2.3	Субклонирование модифицированной части генома ВАВ в промежуточный вектор.....	102
3.2.4	Сборка модифицированного генома ВАВ в бинарном векторе	103
3.2.5	Экспрессия гетерологичных белков в векторе на основе полного генома ВАВ.....	104
3.3	Разработка вектора путем деконструирования генома ВАВ. Замена ОРС4 на гетерологичный ген.....	110
3.3.1	Удаление ОРС4 из генома ВАВ	111
3.3.2	Субклонирование кассеты, несущей последовательности 2А пептидов и гетерологичный ген.....	112
3.3.3	Сборка модифицированной части генома в промежуточном векторе.....	113
3.3.4	Сборка модифицированного генома в бинарном векторе.....	113
3.3.5	Создание трансгенных растений, несущих ген капсидного белка вируса А винограда.....	115
3.3.6	Экспрессия гетерологичных белков в векторе с	

деконструированным геномом.....	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	123
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	127
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	151

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

AlkB – alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylase (оксидоредуктаза)
cdiGRP – cadmium-induced glycine-rich protein (кадмий - индуцируемый, глицин богатый белок)
VIGS – virus-induced gene silencing (индуцированное вирусом замалчивание генов)
(+) РНК – РНК геном вируса с позитивной полярностью
(-) РНК – РНК геном вируса с негативной полярностью
АВК - А вирус картофеля
а.о. – аминокислотный остаток
АФ – алкалиновая фосфотаза
БП – белок передвижения
ВAB – вирус А винограда
BaСЛВ – вирусы, ассоциированные со скручиванием листьев винограда
ВКУВ – вирус короткоузлия винограда
ВНПЖС – вирус некротического пожелтения жилок свеклы;
ВМЦК – вирус мозаики цветной капусты
ВПТ – вирус погремковости табака
ВПЧ – вирусоподобные частицы
ВСЛВ – вирус скручивания листьев винограда
ВТМ – вирус табачной мозаики
ВХПЛЯ – вирус хлоротической пятнистости листьев яблони
ВШМЯ – вирус штриховатой мозаики ячменя
ВЭМ – вирус энцефаломиокардита
к.б. – килобаза
КБ – капсидный белок
кДНК – комплементарная ДНК
КМ – клетки мезофилла
КП – клетки паренхимы
КС – клетки- спутники
КСТ – клетки ситовидных трубок
м - РНК – матричная рибонуклеиновая кислота
МОВВ – международная организация виноградарства и виноделия
НК – нуклеиновая кислота
НТО – нетранслируемая область
ОРС – открытая рамка считывания
п.о. – пар оснований
ПМЭ – пектинметилэстераза
СБ – сырая биомасса
сРНК– субгеномная РНК
СРП – саморазрезающийся пептид
уЗФБ – усиленный зеленый флуоресцентный белок
ХВК – Х вирус картофеля

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Работа посвящена разработке вирусного вектора на основе генома вируса А винограда (ВAB) путем использования стратегий полного генома и деконструирования генома, а также изучению эффективности экспрессии гетерологичных белков (зеленый флуоресцентный белок и капсидный белок вируса хлоротической пятнистости листьев яблони) в полученных векторах.

Актуальность исследования. Сельское хозяйство занимает одну из главных позиций в продовольственном секторе. В настоящий момент, потребление растительной продукции стоит на первом месте по сравнению с другими областями сельскохозяйственного сектора. Виноград является одной из самых важных и древних сельскохозяйственных культур в мире. Были обнаружены доказательства культивирования винограда 8000 тыс лет назад [1]. Согласно данным международной организации виноградарства и виноделия (MOVB), в 2014 году было собрано 75 миллионов тон винограда во всем мире. В настоящий момент известно, что виноград произрастает на 7.5 миллионов гектар. По данным Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан, в 2016 году площадь, занимаемая под виноградники в стране, составила 14,6 тысяч гектар. Промышленное выращивание винограда в Республике Казахстан сосредоточено в Южно - Казахстанской, Алматинской, Жамбылской и Кызылординской областях. В связи с реализацией программы «Программа восстановления и развития виноградарства в Казахстане» с 2001 по 2008 годы, возделываемые площади под виноградники постепенно увеличиваются. Данные, полученные в 2016 году агентством Республики Казахстан по статистике, показывают, что валовый сбор винограда в стране составил 75 тысяч тонн. Использование винограда как основного компонента в приготовлении вина, изюма, безалкогольных напитков, винного уксуса и так далее приводит к необходимости защиты его от патогенов и вредителей. Основные потери урожая винограда ассоциированы с вирусами, которые могут приводить к гибели до 80% растений поля. Самое большое разнообразие вирусов способно поражать именно виноград при сравнении с другими сельскохозяйственными культурами. 70 различных видов вирусов (17 семейств и 27 родов) поражают виноград. Вирусы занимают вторую позицию после грибов по степени вредоносности для сельскохозяйственных культур [2]. Экономические потери от вирусов растений по всему миру составляют несколько миллиардов долларов ежегодно [3]. В виду чего, ведутся работы по разработке более чувствительных методов диагностики вирусов, а также созданию растений устойчивых к вирусной инфекции. В настоящий момент, способность вирусов амплифицироваться с высокой эффективностью в клетках растений используют для создания векторов с целью получения важных белков для нужд медицины и сельского хозяйства. Геномы вирусов модифицируют путем внедрения гетерологичного гена, который кодирует такие важные белки как антитела, инсулин, антигенные белки возбудителей бешенства, чумы, В-субъединицы термолабильного энтеротоксина с последующей экспрессией в

растениях. Генетическая инженерия векторов на основе геномов вирусов занимает лидирующую позицию по сравнению с использованием трансгенных растений для производства гетерологичных белков в растениях. Использование вирусных векторов позволяет избежать внедрение вирусных генов в геном растений и получать интересные белки в растениях методом транзientной экспрессии (временная экспрессия).

Первыми фармакологическими белками, полученными в растениях, были вакцины против вируса, вызывающего заболевание Ньюкасл (Dow AgroSciences), антитела (Planet Biotechnology), глюкоцеребозидазы (Protalix Biotherapeutics). Данные белки были получены путем создания трансгенных растений. На примере вышеуказанных белков, было показано, что растения могут использоваться как биофабрики. Ранее, белки для нужд медицины были продуцированы исключительно в клетках животного происхождения или в дрожжах. Но использование растений как биофабрик дает ряд преимуществ по сравнению с остальными методами продукции, это, прежде всего отсутствие общих патогенов для растений и животных, отсутствие необходимости в специализированном оборудовании для выращивания растений по сравнению с выращиванием клеток животных, быстрое масштабирование производства [4]. Трансгенные растения для производства целевых белков, как было упомянуто выше, в настоящий момент практически не используются, что связано с развитием метода транзientной экспрессии при использовании вирусных векторов. Преимуществом транзientной экспрессии является высокий выход продукта, короткое время получения гетерологичного белка (2-10 дней), гибкость системы. Доставка модифицированного вирусного генома с помощью агробактерий позволило в разы увеличить эффективность трансформации растительных клеток и естественно, повысить уровень выхода целевого продукта. Данная технология, использующая агробактерии для доставки рекомбинантного генома вируса в клетки растений и вирусный геном для экспрессии гетерологичных белков, носит название магнифекшн («Magnifection») или комплексной технологии получения рекомбинантных белков. Такие компании как Icon Genetics (Германия), Mapp Biopharmaceutical (США), Caliber Biotherapeutics (США), PlantForm (Канада) используют комплексную технологию для производства биофармакологических препаратов для всего мира [4, p. 158]. Получение рекомбинантных белков с помощью транзientной экспрессии оценивается в 10-30% от количества общего растворимого белка, что в разы больше по сравнению с получением белков при создании трансгенных растений. На данный момент, известные вирусные векторы для получения целевых продуктов в растениях в промышленных масштабах основываются на геномах следующих вирусов: вируса табачной мозаики, X вируса картофеля, вируса мозаики коровьего гороха, вируса мозаики люцерны. Среди отечественных вирусных векторов, известны разработки по модификации генома вируса кустистой карликовости томатов [5]. На данный момент, работ по экспрессии коммерческих рекомбинантных белков в отечественных векторах не известно. Для разработки вирусных

векторов используют две основные стратегии. Первая стратегия основывается на использовании полного генома вируса с дополнительной инсерцией гетерологичного гена. При этом вирус сохраняет вирулентность, и процессы жизненного цикла вируса не нарушены. На данный момент, известно производство вакцины против лимфомы (Large Scale Biology Corp, США) при использовании полного генома вируса ВТМ. Но, данный метод обладает рядом недостатков, к которым относятся: низкая естественная вирулентная способность вируса (вирус не способен заразить все клетки растений ввиду работы иммунной системы растений); узкая специфичность; высокий уровень экспрессии собственных белков, в особенности капсидного белка (экспрессия гетерологичного белка ниже, чем экспрессия капсидного белка вируса); образование вирионов (образование вирионов приводит к повреждению клеток и тканей растений и соответственно к процессам некроза, что предотвращает распространение вирусной инфекции). В виду чего были разработаны вирусные векторы второго поколения или деконструированные векторы. В данном случае для создания вектора используется стратегия «деконструированного генома». Для преодоления проблем связанных с использованием векторов на основе полного генома, в создании деконструированного вектора, геном вируса модифицируют путем удаления одного или нескольких генов вируса с последующей заменой на гетерологичный ген. В большинстве случаев заменяется ген, кодирующий капсидный белок, так как субгеномные промоторы капсидных белков являются очень сильными и при серологическом анализе было обнаружено большего всего в зараженных растениях именно капсидного белка.

Объект исследования. Вирус А винограда

Предмет исследования. Модификация генома ВАВ для разработки вирусных векторов. Экспрессия гетерологичных белков (зеленый флуоресцентный белок и капсидный белок вируса хлоротической пятнистости листьев яблони) в растениях при использовании вектора с заменой ОРС4 на гетерологичный ген и вектора на основе полного генома ВАВ.

Цель и задачи работы: Целью работы является создание вирусного вектора на основе генома ВАВ для экспрессии рекомбинантных белков в растениях.

Задачи исследования.

1. Филогенетический анализ РА-3 изолята вируса А винограда
2. Модификация вирусного генома путем внесения гетерологичного гена между ОРС 4, кодирующей капсидный белок вируса, и ОРС 5, кодирующей супрессор РНК-интерференции.
3. Модификация вирусного генома путем замены ОРС 4, кодирующей капсидный белок вируса, на гетерологичный ген.
4. Изучение экспрессии гетерологичного белка в вирусном векторе, основанном на полном геноме вируса (внесение гетерологичного гена между ОРС4 и ОРС5).
5. Разработка трансгенных растений, несущих ген капсидного белка.

6. Изучение экспрессии гетерологичного белка в вирусном векторе, основанном на деконструированном геноме вируса (замена ORC4 на гетерологичный ген).

Научная новизна исследования. В данной работе впервые было произведено внесение гетерологичных генов под контроль субгеномного промотора капсидного белка ВАВ. В векторе на основе полного генома ВАВ, гетерологичный ген был внесен между открытой рамкой считывания 4 и открытой рамкой считывания 5. В векторе на основе деконструированного генома ВАВ, открытая рамка считывания 4 была заменена гетерологичным геном. Ранее созданные векторы на основе генома ВАВ были разработаны путем внесения гетерологичных генов под контроль субгеномного промотора ORC2, которые обладали низкой экспрессией целевых белков. С помощью разработанных векторов, в растениях *Nicotiana benthamiana* были успешно экспрессированы зеленый флуоресцентный белок и капсидный белок вируса хлоротической пятнистости листьев яблони на уровне экспрессии капсидного белка дикого ВАВ. Наличие дополнительных 19 - и аминокислот на С - конце капсидного белка ВАВ не влияют на упаковку генома в капсид и его передвижение по растению. Экспериментально показано повышение эффективности экспрессии гетерологичных белков в трансгенных растениях, несущих капсидный белок ВАВ, при агроинфекции вирусным вектором на основе деконструированного генома ВАВ. Отсутствие экспрессии капсидного белка ВАВ значительно влияет на накопление как вирусной РНК, так и белков. Впервые продемонстрирована эффективность экспрессии гетерологичных белков в вирусных векторах на основе генома вируса А винограда с помощью 2А пептидов.

Теоретическая значимость работы заключается в получении результатов исследования, которые значительно расширяют знания в области молекулярной биологии ВАВ. Впервые показано, что гетерологичный ген может быть расположен под контроль субгеномного промотора ВАВ не смотря на перекрывающиеся рамки считывания вирусного генома. Определено, что внесение гетерологичных генов в геном ВАВ между ORC4 и ORC5 не влияет на транскрипцию и амплификацию вируса. Показана возможность упаковки вируса в капсид и передвижение вируса по растению при наличии дополнительных 19 - и аминокислот на С-конце капсидного белка ВАВ. Определено, что удаление капсидного белка из генома ВАВ значительно влияет на накопление вирусной РНК и белков. Получение рекомбинантных белков в растениях с помощью вектора с заменой ORC4 может осуществляться только при восстановлении экспрессии капсидного белка ВАВ в транс-системах.

Практическая ценность исследования заключается в конструировании вирусных векторов на основе генома ВАВ, которые могут быть использованы для получения рекомбинантных белков в растениях для нужд медицины и сельского хозяйства. Вирусные векторы занимают лидирующую позицию в создании вакцин и экспрессии антител, пептидных гормонов. Получение рекомбинантного белка может быть осуществлено за 4-10 дней при

использовании современной комплексной технологии. 2А пептиды в разработанных вирусных векторах позволят внести более чем один гетерологичный ген, что является актуальным при экспрессии антител или вирусоподобных частиц (ВПЧ) при разработке вакцин. С помощью разработанных векторов, в растениях *Nicotiana benthamiana* могут быть успешно экспрессированы целевые белки на уровне экспрессии капсидного белка дикого ВАВ. Разработанные вирусные вектора могут быть использованы в научных целях, для исследования процессов РНК-интерференции, молекулярных механизмов передвижения вирусов, взаимодействия хозяин – патоген, функциональной геномики винограда.

Основные положения, выносимые на защиту:

Изолят РА-3 ВАВ по филогенетическому анализу распределяется в группу I, изоляты данной группы обладают средней патогенностью и не вызывают обширного некроза.

Уровень экспрессии гетерологичных белков в вирусном векторе на основе полного генома ВАВ соответствует уровню экспрессии капсидного белка немодифицированного ВАВ.

Вирус на основе полного генома ВАВ способен передвигаться по растению как локально, так и системно. Дополнительные 19 аминокислот на С-конце капсидного белка ВАВ не препятствуют упаковке вируса в капсид.

Уровень накопления субгеномных РНК, кодирующих гетерологичный ген, и гетерологичных белков в трансгенных растениях выше в 7 раз по сравнению с уровнем накопления в нетрансгенных растениях для вирусного вектора с заменой открытой рамки считывания 4 на гетерологичный ген. Разработанные трансгенные растения несут ген капсидного белка ВАВ.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнена в рамках научных проектов 1334/ГФ «Разработка вирусного вектора для получения рекомбинантных белков в растениях», № AP05132367 «Биотехнология получения вакцин в растениях с использованием вирусного вектора»

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены:

- на Международной конференции «Plant biology and biotechnology. International conference» (2014, Алматы, Казахстан);
- на Международной конференции «Global Genome Biodiversity Network (GGBN)» (2014, Лондон, Англия);
- на Международной конференции «Глобальные изменения климата и Биоразнообразии» (2015, Алматы, Казахстан);
- на IV Международных Фарабиевских чтениях (2017, Алматы, Казахстан);
- на 4-ой Международной конференции «Генетика, Геномика, Биоинформатика, и Биотехнология растений» (2017, Алматы, Казахстан);
- на Международном саммите «Global summit on Plant Science» (2017, Рим, Италия);

- на Международной конференции «Smart Bio» (2017, Каунас, Литва);
- на Международной конференции «International virology conference» (2017, Торонто, Канада);

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 19-ти печатных работах, в том числе 3 статьи и 1 тезис в журналах с импакт-фактором, 5 статей в республиканских научных журналах из перечня Комитета, 10 тезисов в материалах международных конференций и саммитов, 2 патента и 1 заявка на патент и 2 авторских свидетельства, 2 акта внедрения научно-технической разработки.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 179 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка использованных источников из 358 наименований из них 353 на английском языке; содержит 7 таблиц, 65 рисунков и 11 приложений.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Вирусы растений

Вирусы растений включают 49 семейств известных на данный момент [6]. С появлением усовершенствованных методов секвенирования количество новых видов вирусов ежегодно возрастает. Среди недавно открытых болезней растений, вирусная инфекция составляет 47% случаев [7]. Вирусы являются наиболее опасными патогенами растений, так как не имеется эффективных химических или биологических средств борьбы с ними. Опасность вирусной инфекции заключается в сложности контроля распространения вирусов, наличие естественных переносчиков приводит к необходимости комплексной диагностики растительного материала, почвы для предотвращения первичного и вторичного инфицирования. Наличие сорняков приводит к постоянной повторной интродукции вирусной инфекции на полях, так как сорняки являются природными резервуарами вирусов. Для каждого культурного растения известен как минимум один вирус, способный его поражать [8]. Наиболее экономически важными культурными растениями в настоящий момент являются пшеница, картофель, кукуруза, рис, сахарная свекла, виноград. Каждая из перечисленных культур подвержена заражению вирусами, которые приводят к большим потерям количества и качества урожая. К примеру, наиболее опасные вирусные заболевания картофеля ассоциированы с такими вирусами как, X вирус картофеля (ВХК), вирус скручивания листьев картофеля, Y вирус картофеля. В связи с данными вирусами, урожайность картофеля снижается на 40-50% ежегодно, а потери семенного материала при хранении составляют 15-20% [9]. Вирусы пшеницы приводят к потерям, оцениваемым в 35 миллионов долларов ежегодно [10]. Вирус желтой карликовости ячменя, вирус полосатой мозаики пшеницы, вирус мозаики пшеницы приносят наибольший экономический вред по сравнению с другими вирусами пшеницы [11]. Наиболее опасными и распространенными вирусами сахарной свеклы являются: вирус некротического пожелтения жилок свеклы [12], вирус желтухи сахарной свеклы (снижение урожая семян до 30-40%), вирус мозаики сахарной свеклы [13]. Снижение количества и качества урожая винограда связано с такими опасными и широко распространенными вирусами, как вирус короткоузлия винограда (ВКУВ), вирус скручивания листьев винограда (ВСЛВ) [14], вирус А винограда [15].

Вирусы растений классифицируют в зависимости от качества генома (рисунок 1), свойств полимеразы, капсидного белка, по серологическому анализу и так далее. Для выделения порядка рассматриваются следующие основные характеристики семейств вирусов: стратегии репликации генома; организация генома; строение вирусной частицы. Для определения семейства вирусов, рассматриваются следующие характеристики родов: стратегии репликации генома; организацию генома и природу вирусной оболочки [16].

По системе классификации вирусов принято использовать следующие окончания, для вида и рода -*virus*, для семейства -*viridae*, для порядка -*virales*.

Рассматривая вирус А винограда, порядком является *Tymovirales*, семейство – *Betaflexiviridae* и род – *Vitivirus*.

Как известно, вирусы подвержены сильному эволюционному прессу. Благодаря наличию полимераз, участвующих в репликации генома, лишенных 3'-5' экзонуклеазной активности вирусы очень быстро эволюционируют, что дает им возможность приспосабливаться к новым условиям. Ввиду чего, для вирусов введено понятие квазивиды. При заражении растения одним штаммом вируса, после размножения вируса в клетках растения, получается генетически неоднородное потомство. Данная генетически неоднородная популяция участвует в развитии симптомов вирусной инфекции. Полученные модели по изучению степени мутирования генома показывают, что существует критичный уровень мутабельности за пределами которого теряется генетическое значение первоначального штамма.

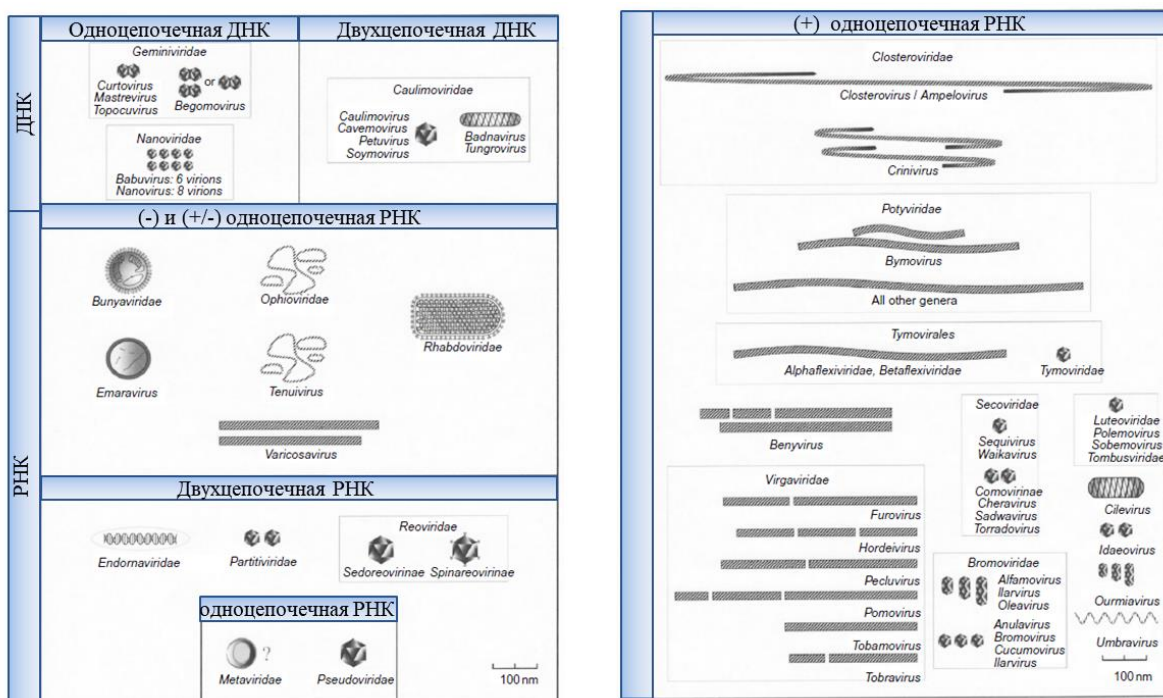


Рисунок 1 – Классификация вирусов растений в зависимости от природы генома [16]

На примере моделей было установлено, что высокий уровень мутабельности и низкий уровень репликации дает больше преимуществ для выживания вирусов, нежели высокий уровень репликации и низкий уровень мутабельности [17]. Уровень мутабельности в разных растениях, являющихся естественными хозяевами, будет отличаться, как было показано для вируса некротического пожелтения жилок свеклы (ВНПЖС). В зависимости от органа заражаемого растения также наблюдаются генетические вариации потомства вирусов [18]. Кроме того, вирусы, обладающие высокой вирулентностью, подвержены более сильному прессу со стороны эволюции, нежели мутуалисты, что связано с работой иммунной системы растений и

постоянным процессом ко-эволюции [19]. В виду чего, вид вирусов определяют, как совокупность штаммов и изолятов с гомологичными свойствами.

1.1.1 Строение вирусной частицы

Вирусный геном растений в большинстве случаев защищен оболочкой, состоящей из одного или нескольких типов капсидного белка. Данная оболочка позволяет предотвратить разрушение генома нуклеазами или разрыв при механическом воздействии. Кроме того, оболочка участвует в таких важных процессах жизнедеятельности вирусов как передвижение между клетками при использовании плазмодесмат, а также в системном передвижении вирусов. Большое значение оболочка имеет для вирусов, использующих естественные переносчики (насекомые, нематоды, грибы) для заражения растений. Некоторые вирусы, благодаря распознаванию через капсидные белки, могут размножаться в клетках переносчиков. По строению вирусной частицы выделяют филаментозные и изометрические вирусы. Филаментозные вирусы имеют нитевидную структуру с упорядоченно расположенными капсидными белками вокруг генома. Преимущество филаментозных вирусов для разработки векторов заключается в способности упаковывать неограниченный размер генома по сравнению с изометрическими вирусами. Капсидная оболочка нитевидных вирусов может быть жесткой или гибкой структуры. Род *Tombovirus* содержит виды вирусов с жесткой филаментозной оболочкой. Капсидные белки, формирующие оболочку, четко упорядочены и связаны с геномом вируса. Ярким представителем данного рода является вирус табачной мозаики (ВТМ). Вирусная частица ВТМ имеет размер около 300 нм в длину и 4 нм в диаметре [20], рисунок 2.

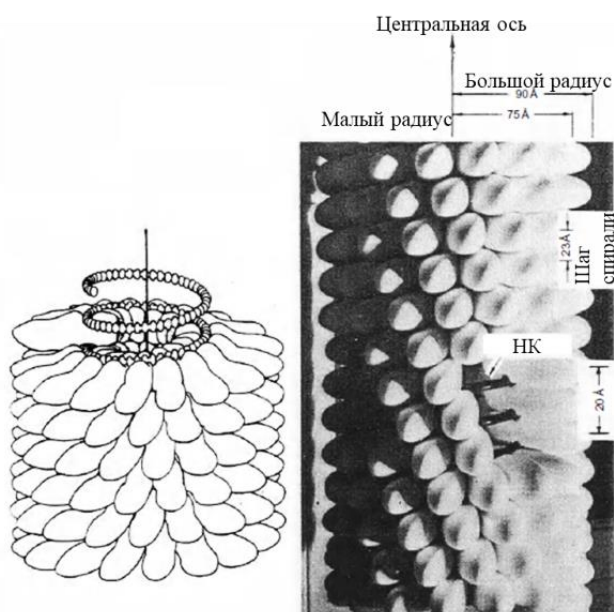


Рисунок 2 – Модель строения вирусной частицы ВТМ [21]

Вирион ВТМ состоит из 95% белка и 5% нуклеиновой кислоты. С помощью кристаллографического анализа было выявлено количество капсидных субъединиц, участвующих в формировании оболочки, данное число составило около 2130 субъединиц. Кроме того, было показано, что с каждой субъединицей взаимодействует около 3-х нуклеотидов. Геном, в вирусной частицы, организован в виде правозакрученной спирали [21, р. 292]. Капсидный белок ТМВ содержит около 158 аминокислот, а вес белка составляет 17-18 кДа [22]. 50% аминокислотных остатков формируют 4 альфа-спирали и 10%- бета-складчатость. Альфа-спирали участвует в организации ядра белка и соединены с бета-складчатостью. С и N- концы белка обращены наружу. Важную роль в сборке и «раздевании» вирусной частицы играют Glu⁹⁵-Glu¹⁰⁶, Glu⁵⁰- Asp⁷⁷ аминокислотные последовательности капсидного белка [23]. Кроме того, было выявлена специфичность связывания капсидных белков с РНК молекулой. Эксперименты по изучению связывания к-ДНК генома с капсидными белками показали отсутствие возможности образования связей, что говорит о специфичности связывания с РНК молекулой, возможно ввиду связывания с рибозой или тимидином [24]. ВТМ является классическим представителем вирусов растений, ввиду чего, молекулярная биология данного вируса очень хорошо изучена. Помимо рода *Tombovirus* к вирусам с жесткой филаментозной оболочкой относят вирусы родов *Tobravirus*, *Hordeivirus*, *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus*, *Benyvirus* и *Varicosavirus*. К вирусам с гибкой нитевидной структурой относят вирусы семейств *Alphaflexidae*, *Betaflexiviridae*, *Potyviridae*, *Closteroviridae*. В настоящий момент хорошо изучено строение вирусов рода *Potexvirus* семейства *Alphaflexidae* и родов *Potyvirus*, *Rymovirus* и *Tritimovirus*, относящихся к семейству *Potyviridae*. Одним из ярких представителей рода *Potexvirus* является Х вирус картофеля. Вирион ХВК содержит около 1300 идентичных капсидных белков, которые образуют спираль вокруг генома. Размер шага витка составляет 36 Å, в одном витке участвует 8,9 субъединиц [25-26]. 5 нуклеотидов геномной РНК, участвует во взаимодействии с каждым капсидным белком. Капсидный белок ХВК состоит из 236 аминокислотных остатков, которые формируют 7 альфа - спиралей, формирующих 2-е субъединицы, внутренний четырехспиральный узел, 4 бета - складчатости и внешнюю альфа-бета - субъединицу [27-28]. N - терминальный сегмент капсидного белка вируса ХВК гликозилирован и содержит моносахарид, галактозу или фруктозу [29]. Данный сегмент играет важную роль в поддержании правильной поверхностной структуры вириона.

Изометрические (сферические) вирусы располагают белковой оболочкой, где субъединицы (капсидный белок) расположены по принципу кубической симметрии и их количество кратно 12. Кубическая симметрия включает 3 типа: тетраэдральная (3:2), октаэдральная (4:3:2), икосаэдральная (5:3:2). Все три типа кубической симметрии встречается у вирусов сферической формы. Доминирующей кубической симметрией у сферических вирусов является икосаэдральная форма [30], ввиду чего, зачастую сферические вирусы именуют икосаэдрическими, рисунок 3. Среди изученных изометрических вирусов

растений, сателлитный вирус некроза табака обладает наименьшим количеством субъединиц (60) с диаметром молекулы около 17 нм. Наибольшим количеством субъединиц (780) обладает вирус опухолей ран растений с диаметром вирусной частицы около 75 нм. В отличие от капсидных белков филаментозных вирусов, капсидные белки вирусов с простой икосаэдрической симметрией образуют в большей мере бета-складчатости нежели альфа-спирали.

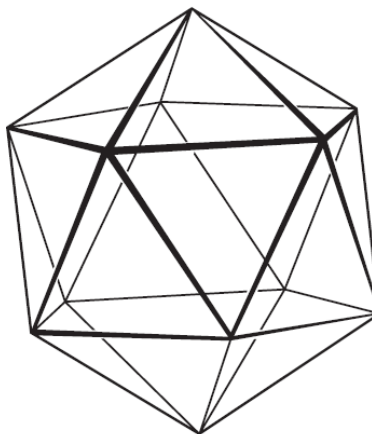


Рисунок 3 – Иллюстрация правильного икосаэдра, малые сферические вирусы имеют подобную икосаэдральную структуру вирусной частицы.

Икосаэдр содержит 12 вершин, 30 ребер, 20 идентичных треугольных поверхностей, 3 капсидных белка могут быть расположены на каждой из 20 сторон.

Капсидный белок простых икосаэдрических вирусов может содержать до 3 доменов, S (поверхностный) домен, R (образующий случайные связи) домен и P (выступающий за пределы оболочки) домен. Во всех простых икосаэдрических вирусах был обнаружен S- домен, который участвует в образовании непосредственно поверхностной оболочки. R- домен, включает N-терминальную часть белка и участвует в связывании РНК генома вируса. P- домен, участвует в образовании выступов на поверхности белковой оболочки вируса [31]. Сборка вирусной оболочки из капсидных белков зависит от таких факторов, как рН среда, ионная сила, температура. Ключевым моментом в сборке вирусной частицы является процесс нуклеации, сборка капсида путем образования связей между геномом вируса и капсидными белками [32]. К родам вирусов растений с простой икосаэдрической симметрией относят: *Alfamovirus*, *Ilarvirus*, *Ourmiavirus*, *Geminivirus*, *Tymovirus*, *Bromovirus*, *Cuscutavirus*. Все рода семейства *Tombusviridae* включают виды вирусов с простой икосаэдрической симметрией.

Изометрические вирусы растений со сложной геометрической симметрией включают *Phytoreovirus*, *Oryzavirus*, *Fijivirus* рода. Структура частицы вируса карликовости риса, который относится к роду *Phytoreovirus*, хорошо изучена и созданы модели строения капсида вируса [33-36]. Вирусная оболочка состоит из двух разных слоев и в формировании данных слоев

участвуют разные по природе капсидные белки. Внешняя оболочка состоит из белка Р8 (46 кДа) и образует 260 тримерных кластеров, внутренняя оболочка состоит из капсидного белка Р3 (114 кДа) и образует 60 димеров. Белок Р8 имеет 2 важных домена (1 и 2), домен 1 состоит из альфа-спиралей в то время, как домен 2 состоит из бета-складчатостей и расположен на поверхности первого слоя. Кроме того, среди вирусов растений имеются вирусы с суперкапсидом. К таковым вирусам относят вирусы семейства *Rhabdoviridae*, способные инфицировать беспозвоночных, позвоночных животных и растения [37]. Помимо белковой оболочки или капсидной оболочки, вирусные частицы покрыты дополнительной липидной оболочкой или суперкапсидом.

Доминирование икосаэдрической формы среди изометрических вирусов обусловлено эволюционным прессом, который способствовал отбору стабильной формы с наибольшей вместительной емкостью.

1.1.2 Строение генома вирусов

Базовое строение генома вирусов растений включает наличие кодирующих и не кодирующих участков. Кодирующие участки генома участвуют в экспрессии белков, ответственных за инфицирование, размножение, локальное и системное передвижение вируса, взаимодействие хозяин – патоген, взаимодействие с естественными переносчиками, супрессию иммунной системы растений. Не кодирующие регионы участвуют в регуляции процессов репликации и экспрессии вирусного генома. К базовым не кодирующим регионам относят простые или геномные промоторы, субгеномные промоторы, энхансеры и супрессоры транскрипции. Вирусный геном по природе может быть ДНК или РНК, одноцепочечной или двухцепочечной формы, линейной или замкнутой структуры, рисунок. Геном с одноцепочечной ДНК молекулой вирусов растений является маленьким по размеру и замкнутым. Генетическая информация генома может быть распределена на одной молекуле или на нескольких молекулах НК. У некоторых представителей рода *Geminivirus*, генетическая информация распределена на 2 молекулах размером в районе 2,5 - 3 кб. Генетическая информация генома вирусов *Nanovirus* и *Babuvirus* родов распределена на 6 или 9 молекулах размером около 1 кб (6). Вирусы с двухцепочечным ДНК геномом реплицируются с помощью процесса обратной транскрипции, через РНК посредник. К представителям с двухцепочечным ДНК геномом относятся вирусы семейства *Caulimoviridae*. Их геном составляет 7,2 - 8,0 кб (6). Представители рода *Metavirus* и *Pseudovirus* являются ретротранспозонами, их двухцепочечный ДНК геном встраивается в геном хозяина, но в вирионе данные вирусы содержат (+) РНК геном, который кодирует такие белки как, gag (аналог КБ) и pol (репликаза). Двухцепочечный РНК геном представителей рода *Edornavirus* распределен на нескольких молекулах, каждая молекула при этом упакована в капсид отдельно от остальных [38]. РНК с негативной полярностью является геномом у представителей *Cytorhabdovirus* и *Nucleorhabdovirus*. Организация генома у вирусов данных родов аналогична с

организацией (–)РНК геномов вирусов животных. Отличием является наличие ОРС, которая кодирует белок передвижения у вирусов растений. Госповирусы с (–)РНК геномом имеют сходства в строении вирусной частицы и организации генома с буньявирусами животных. Большинство же вирусов растений содержат (+)РНК геном. Строение генома у (+)РНК вирусов достаточно разнообразно у представителей разных родов, к примеру представители рода *Vitivirus* имеют геном размером около 7,6 кб, 5'-конец содержит 7-метилгуаниловый кэп, 3'-конец полиаденилирован, содержит 5 ОРС.

Экспрессия вирусного генома происходит всегда при помощи м-РНК [39]. Эволюционно, генетическая информация достаточно компактно кодируется вирусным геномом. С помощью сдвига рамок считывания одна и та же последовательность может кодировать два разных вирусных белка. Зачастую наблюдается перекрытие рамок считывания для экономии места в геноме. Благодаря транскрипции сквозь слабые терминаторы приводит к трансляции разных белков. Количество кодирующих генов у вирусов растений варьирует от 1 гена (сателлитный вирус некроза табака) до 12 генов (клостеровирусы, реовирусы) [8, р. 249-251]. Большинство РНК - содержащих вирусов с позитивной полярностью генома кодируют от 4-7 белков. Некодирующие регионы одноцепочечных РНК - содержащих вирусов расположены на 5' или 3' - концах, а также могут располагаться в середине генома, к примеру, субгеномные промотеры.

1.1.2.1 РНК вирусы с геномом позитивной полярности

Вирусы растений с геномом позитивной полярности имеют значительное сходство с (+) РНК вирусами животных в стратегии репликации генома [40]. Было выявлено, что РНК-зависимая РНК полимераз, а также функциональные домены хеликаз, протеиназ консервативны, несмотря на то, что природа данных белков на аминокислотном уровне у вирусов растений и животных различна [41-47]. Различия между (+) РНК вирусами растений и животных заключается в морфологии вирусной частицы, организации генома, круге хозяев вирусов, вызываемых симптомов инфекции [48]. При изучении эволюции вирусов с (+) РНК геномом были выдвинуты следующие положения: вирусы с (+) РНК эволюционируют очень быстро и только очень важные последовательности белков остаются консервативными; базовыми белками для (+) РНК вирусов являются РНК - зависимая РНК полимераз и капсидные белки; только РНК - зависимая РНК полимераз содержит универсальные мотивы, которые являются консервативными у всех (+) РНК вирусов, изученных на данный момент [43, р. 421]. Геномная РНК у (+) РНК вирусов выполняет одновременно 2 функции, первая функция заключается в непосредственной экспрессии белков вирусов с (+) РНК генома, как только вирус проник в клетки растений, вторая функция заключается в транскрипции (–) РНК цепи на матрице (+) РНК цепи для последующей репликации генома. Репликация вирусного генома вовлекает в процесс одновременно как вирусные белки, так и белки клеток хозяина. Для успешной репликации вируса в клетках растений

необходимо успешное комплексное и регулируемое взаимодействие патогена - хозяина на всех этапах процесса. Жизненный цикл (+) РНК вирусов включает 7 этапов: 1 этап заключается в инфицировании клеток, проникновение вируса в клетку хозяина с последующей доставкой вириона к месту репликации генома, при этом вирион частично распакован в области 5'- конца генома; 2-ой этап представляет собой полную распаковку вирусного генома, распакованный геном напрямую служит м-РНК для трансляции РНК-зависимой РНК полимеразы. Такие процессы, как распаковка вирусного генома, синтез РНК репликазы, репликация генома, экспрессия генома частично перекрываются; 3-ий этап включает синтез РНК-репликазы, данный этап является лимитирующим в размножении (+) РНК вирусов, ввиду того, что в клетках растений не имеется соответствующих полимераз для эксплуатации. РНК-репликаза участвует в синтезе (-) РНК цепи на матрице генома, (+) РНК цепи на матрице (-) РНК цепи, а также в синтезе субгеномных РНК; 4 - ый этап заключается в репликации вирусного генома. Для репликации вирусного генома, изначально синтезируется (-) РНК цепь на матрице генома путем связывания репликазного комплекса с 3'- нетранслируемой областью (+) РНК генома [49] и РНК-зависимая РНК полимераз синтезирует (-) РНК цепь комплементарную геному вируса. При этом образуется двухцепочечная молекула РНК, которая именуется репликативной формой. Высвобождение (-) РНК и (+) РНК цепи из репликативной формы осуществляется с помощью вирусной геликазы. Далее, (+) РНК цепь генома синтезируется путем связывания репликазного комплекса с 3'- нетранслируемой областью (-) РНК - цепи и последующего синтеза (+) РНК цепи комплементарной (-) РНК цепи, что приводит к формированию двухцепочечной молекулы – промежуточной репликативной РНК. 5' и 3'- нетранслируемые области (+) РНК вирусов содержат базовые промоторы репликации, которые относятся к цис - регуляторным элементам. Цис - регуляторные элементы помимо базовых промоторов включают промоторы транскрипции, а также энхансеры и терминаторы, данные регуляторные элементы необходимы для контроля репликации и транскрипции вирусного генома. Для того чтобы начался непосредственно процесс репликации необходимо переключение процесса трансляции на репликацию, так как в первую очередь, при проникновении вируса в клетку, вирусный геном служит матричной РНК для синтеза репликаз [50]. Переключение трансляции на репликацию необходимо ввиду того, что трансляция в направлении от 5' к 3' приводит к блокированию процесса репликации в обратном направлении. У вируса мозаики костра переключение между двумя процессами происходит за счет вирусных 1а, геликазоподобных репликативных белков [51]. Базовые промоторы для синтеза (-) РНК цепи у вирусов с геномом позитивной полярности, могут быть различной структуры такой, как т-РНК подобные структуры, поли-А хвосты, псевдокноты, шпильки, короткие последовательности без высокоупорядоченной структуры [52]. Синтез (+) РНК цепи на (-) цепи представляет собой асимметрический процесс, накопление (+) цепи в разы превышает наличие (-) цепи. На одной и той же молекуле (-) цепи

может несколько раз синтезироваться (+) цепь. Соотношение (+) цепи к (–) цепи, во время репликации, может составлять 1000:1 [53]. Помимо геномной (+) РНК цепи на (–) РНК цепи могут синтезироваться субгеномные РНК, необходимые для трансляции белков вируса, участвующих в процессах передвижения, оборачивания вируса, а также супрессии РНК-интерференции. Синтез субгеномных РНК осуществляется через распознавание внутренних/субгеномных промоторов РНК-зависимой РНК полимеразой. Несмотря на различие в строении субгеномных и базовых промоторов, вирусная РНК - зависимая РНК полимеразы с успехом их распознает [54]; 5-ый этап жизненного цикла вирусов включает трансляцию структурных и неструктурных вирусных белков, экспрессия вирусного генома. Стратегии экспрессии вирусных генов включают: синтез субгеномных РНК (сРНК); использование полицистронной РНК; перекрытие ОРС; сквозное прочитывание сквозь терминаторы; сдвиг рамки считывания; синтез полипротеинов с последующим разрезанием на функциональные белки; сплайсинг РНК. Данные стратегии экспрессии белков позволяют вирусам максимально уменьшать размер функционального генома; 6-ой этап заключается в упаковывании вирусного генома в белковую оболочку/капсид. Упаковывание в капсид осуществляется через связь белок - РНК, где распознаются геномные РНК капсидными белками. Но, формирование пустых вирусных частиц без наличия геномной РНК также отмечается; 7-ым этапом является созревание вирусных частиц, выход из зараженных клеток и системное заражение, а также горизонтальный перенос [55].

Геномная РНК, (+) РНК вирусов, состоит из кодирующих и не кодирующих регионов, как было описано выше. 5'-конец может содержать одну из трех следующих структур: кэп-подобную структуру, вирусный белок ковалентно соединенный с геномом (VPg), ди- или трифосфат. Геномная РНК не всегда содержит специализированную структуру на 5'-конце. Известны (+) РНК вирусы, такие как потивирсы, которые не содержат 5'-кэп - структуру. Инициация трансляции в данном случае осуществляется за счет сайтов внутренней посадки рибосомы [56-58].

5'-НТО, как правило, является короткой, в отличие от 3'-НТО. 3'-НТО может достигать до 300 п.н. 3'-конец генома может содержать поли-А хвост, т-РНК подобные структуры, псевдокноты и так далее. Геном вируса табачной мозаики имеет 5'-кэп - структуру, но лишен поли-А хвоста [59]. Псевдокнот регион, который расположен выше т-РНК подобной структуры, как было показано экспериментально выполняет функции поли-А хвоста [60-61]. Вирусы растений, которые не содержат ни 5'-специализированную структуру ни 3' поли-А хвост относятся к родам *Luteovirus* и *Necrovirus*. Трансляция генов вируса желтой карликовости ячменя (*Luteovirus*) требует комплементарных взаимодействий между нуклеотидами шпильчатой структуры, расположенной в 5'-НТО, с нуклеотидами шпильчатой структуры 3'-НТО [62]. Геномная РНК является полицистронной, но транслируются только белки, расположенные на 5'-конце (первый старт кодон), либо экспрессируются все белки путем синтеза

полипептида с последующим расщеплением протеазами. Размеры геномов (+) РНК вирусов варьируют от 1394 п.н. в РНК2 вируса кольцевой пятнистости гвоздики до 15 480 п.н. в геноме некротического вируса желтухи свеклы (клостеровирусы), 20 000 п.н. в геноме тристеа вируса цитрусовых [63-65]. Клостеровирусы имеют самый большой геном среди всех остальных (+) РНК вирусов растений. В настоящий момент среди изученных (+) РНК вирусов, тристеа вирус цитрусовых содержит самый большой геном, его десять 3'-ОРС экспрессируются через 3'- субгеномные РНК. Наличие специализированных структур на 5' и 3'- концах генома приводит к защите РНК генома от деградации в клетках хозяина.

1.2 Вирусы винограда

Виноград является одной из важных плодовых культур во всем мире. Индустрия столового и винного винограда является экономически важной составляющей для многих стран. В Республики Казахстан валовый сбор винограда составил 75 тысяч тонн в 2016 году с 12,3 тыс. гектар виноградников, которые находятся в плодоносящем возрасте. 48,8% площадей виноградников в плодоносящем возрасте расположены в крестьянско-фермерских хозяйствах, 36,1% - на площадях сельскохозяйственных предприятий и 15,1% - в хозяйствах населения страны. 63,2% площадей виноградников в плодоносящем возрасте расположены в Южно-Казахстанской области, 33,8% - в Алматинской области. В 2016 году урожайность винограда составила 60,8 центнеров с гектара, что на 11,5 центнеров или 23,3% превышает уровень 2015 года. Доминирующими сортами виноградников страны являются сорта Саперави, Каберне Фран, Рислинг, Ркацителли, Кульджинский, Тайфи Розовый. Сортами отечественной селекции (Казахский НИИ плодоводства и виноградарства) являются: Алмалы, Айсулу, Ак марал, Алма-Ата, Арман, Береке, Илийский, Каракоз, Кызыл тан, мускат казахстанский, Рахат, Самал, Тянь Шанский. МОБВ в 2016 году проанализировали результаты использования урожая винограда в зависимости от конечного продукта, данные результаты показали, что 55% урожая винограда используется для приготовления вина, 35% урожая употребляется в свежем виде, 8% для культивирования, 2% для приготовления соков и прочих конечных продуктов переработки винограда [66]. Большие экономические потери в секторе виноградарства связаны с вирусными инфекциями, где инфицирование может составлять до 80% поля. Вирусы винограда влияют не только на количество урожая, но также и на его качество. В настоящий момент установлено, что самое большое разнообразие вирусов поражает именно виноград. Известно, что виноград является хозяином для 70 различных видов вирусов (17 семейств, 27 родов). Изученные вирусы винограда (31 вид из 70) распределены в 4 комплекса заболеваний. 1-ый комплекс включает вирусы, вызывающие дегенеративную инфекцию/ снижение урожайности; 2-ой состоит из вирусов, вызывающих скручивание листьев; 3-ий комплекс включает вирусы, ведущие к заболеванию древесины (бороздчатость древесины); 4-ый комплекс состоит из

вирусов, вызывающих образование пятнистости [67]. К вирусам первого комплекса относят: вирусы Европейской линии – вирус короткоузлия винограда, вирус мозаики резухи, вирус черных колец томатов, вирус хромовой мозаики винограда, болгарский латентный вирус винограда, вирус кольцевой пятнистости малины, итальянский латентный вирус артишока, вирус скручивания листьев черешни; Американская линия - вирус кольцевой пятнистости томата, вирус кольцевой пятнистости табака, вирус листовой пятнистости черники, вирус розеточной мозаики персика. Тунисский вирус кольцевой пятнистости винограда из Южной Африки [68], вирус деформации виноградной лозы, анатолийский вирус кольцевой пятнистости винограда из Азии (Турция) [69-70]. Вышеперечисленные вирусы относятся к неповирусам и состоят из изометрического капсида и генома, распределенного на двух (+) РНК молекулах. Геномные РНК содержат поли-А хвост на 3'-конце и VPg белок на 5'-конце [71]. Филогенетический анализ неповирусов, инфицирующих виноград, позволил выделить три субгруппы. Второй комплекс включает вирусы семейства *Closteroviridae*. Клостеровирусы, заражающие виноград, относятся к родам *Closterovirus*, *Ampelovirus* и *Velarivirus* [72]. Представителями являются ВаСЛВ-1, -2, -3, -4, -7, а также штаммы ВаСЛВ-4 вирусы, ассоциированные со скручиванием листьев винограда. Геномы данных вирусов различаются размерами и структурой. Вирусы скручивания листьев винограда передаются путем прививки, а также с помощью природных переносчиков таких, как *Planococcus ficus* [73], *P. Longispinus* [74], *P. Citri* [75], *Pseudococcus affinis* [76], *Ps. longispinus*, *Ps. viburni*, *Ps. maritimus*, and *Ps. Affinis* [77], *Helicococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris* [78], *Pulvinaria vitis* [79-80]. Третий комплекс состоит из вирусов, вызывающих бороздчатость древесины винограда. Впервые заболевание было диагностировано в Италии [81], а затем в Венгрии [82]. Заболевание передается путем прививок винограда. Бороздчатость древесины является комплексным заболеванием и может включать следующие синдромы: ржавчина ствола *Rupestrus* (*Rupestrus stem pitting*), образование желобков у ствола *Kober* (*Kober stem grooving*), пробкообразование (*Corky bark*), образование желобков у ствола LN-33 (*LN-33 stem grooving*). К вирусам, вызывающим бороздчатость древесины, относят: Вирус А винограда, вирус В винограда (BBV), вирус С винограда (BCV), вирус D винограда (BDB), вирус Е винограда (BEB), вирус F винограда (BFB) [83]. Вышеперечисленные вирусы относятся к роду *Vitivirus*. Кроме того, в развитии заболевания бороздчатости древесины участвует вирус ржавчина ствола *Rupestrus* (BPCR), данный вирус относится к роду *Foveavirus* [84]. Естественными переносчиками вирусов бороздчатости древесины являются: для ВAB - *Planococcus citri*, *Pl. ficus*, *Pseudococcus longispinus*, *Ps. affinis*, *Helicococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris*, *Neopulvinaria innumerabilis*; для BBV - *Ps. longispinus*, *Ps. affinis*, *Pl. ficus*, *Ph. Aceris*; для BEB - *Pseudococcus comstocki*; для BDB и BPCR естественные переносчики не известны на данный момент [85]. *Vitiviruses* и *foveaviruses* включают вирусы филаментозной формы [86]. Четвертый комплекс состоит из вирусов, вызывающих пятнистость

винограда. Данное заболевание наибольшее распространение получило среди Американских сортов винограда. Симптомами заболевания является образование полупрозрачных пятен на листе, в результате образования множественных пятен, лист начинает сворачиваться [87]. Данное заболевание вызывается вирусом крапчатости винограда (ВКПВ), который относится к роду *Maculavirus* [88]. Вирус имеет изометрическую форму и содержит одноцепочечный (+) РНК геном [89]. Широкое распространение вирусов в виноградниках осуществляется благодаря прививке, обрезке винограда, а также благодаря природным переносчикам [90]. Современные молекулярно – генетические методы диагностики вирусных инфекций дают возможность с высокой точностью определять смешанную инфекцию, вызванную разными видами вирусов, что позволяет корректировать методы борьбы и профилактики с вирусами.

Анализ опубликованных работ в 2004 году показал, что 5400 статей посвящены вирусам и вириодам винограда [91]. К вирусам винограда, которые имеют важное экономическое значение, относят ВКУВ, ВаСЛВ, ВАВ. Ранее обнаружение ВКУВ было осуществлено во Франции [92], Австрии [93], Италии [94], Германии [95]. На данный момент, ВКУВ распространен на виноградниках всего мира. Обнаружение ВКУВ на территории Республики Казахстан было осуществлено в 2009 году в образцах винограда, собранных с виноградников Алматинской области в рамках проекта «Разработка диагностических тест-систем для выявления вирусов и вириодов экономически важных плодовых культур». Вирус был обнаружен в таких сортах винограда, как Каберне Фран, Саперави. Первое обнаружение ВКУВ в Казахстане было осуществлено в лаборатории молекулярной биологии, НИИ биологии и биотехнологии растений. Обнаружение ВАВ в Казахстане проводится в НИИ биологии и биотехнологии растений и в НИИ плодовоовощеводства. ВКУВ распространяется путем прививки [96] и с помощью природных переносчиков (нематоды) через почву [97]. *Xiphinema index*, *Xiphinema Italiae* являются природными переносчиками вируса ВКУВ [98]. ВКУВ приводит к снижению фотосинтетического потенциала, концентрации хлорофилла в листе, диаметра ствола винограда, длины побегов, диаметра ягод, количества урожая с одного растения [99]. В настоящий момент, известно несколько сортов винограда, которые частично устойчивы к вирусной инфекции или же к природным переносчикам ВКУВ. 2 сорта *V. Vinifera* из Афганистана и Ирана показали устойчивость к ВКУВ, благодаря 2 несцепленным рецессивным генам [100-101]. Сорта винограда из Америки показали высокий уровень чувствительности к *Xiphinema index*, и к ВКУВ [85, р. 180]. Но, отмечен такой сорт, как *Muscadinia rotundifolia*, который устойчив к *Xiphinema index*. Получение гибридов *V. rupestris* × *M. Rotundifolia* позволило повысить уровень устойчивости к ВКУВ. Устойчивость к ВКУВ у гибридов, полученных при скрещивании с *M. Rotundifolia*, связана, прежде всего, с устойчивостью к *Xiphinema index* и контролируется одним доминантным геном [102]. ВКУВ является первым вирусом винограда, для которого был

подтвержден перенос вирусов здоровым растениям с помощью механической инокуляции [103]. Геном ВКУВ состоит из 2-х молекул одноцепочечной (+) РНК, которые упаковываются в разные капсиды. Для инфицирования растения необходимо наличие 2-х молекул генома (РНК1 и РНК2). Экспрессия генома осуществляется через трансляцию двух полипептидов, которые в дальнейшем разрезаются с помощью вирусных протеаз. РНК1 кодирует полипептид размером в 253 кДа, а РНК 2 - 122 кДа. Индикаторными растениями для ВКУВ могут служить растения семейств *Amaranthaceae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Fabaceae* [104-105].

Впервые вирусы винограда, ассоциированные со скручиванием листьев винограда, были выделены и охарактеризованы в Европе (Франция, Италия, Германия, Австрия). В настоящий момент, среди известных 223 сортов *V.vinifera* не обнаружено устойчивых к ВаСЛВ (ВаСЛВ-1, ВаСЛВ-2) [106]. ВаСЛВ приводят к снижению количества урожая [107-115], нарушению пигментации [116], затормаживанию процессов созревания плодов [117], уменьшению размера винограда [118-124], недостатку калия и кальция [125-126], снижению фотосинтетической активности [127-129], уменьшению количества и размера побегов у растений винограда [119]. По результатам изучения шести коммерческих виноградников, четыре содержало растения винограда, инфицированных ВаСЛВ. 30% заражение виноградника ВаСЛВ приводит к экономическим потерям в 25000 - 40000 долларов с гектара [130]. В Казахстане ВаСЛВ был обнаружен в 2009 году в образцах винограда сорта Саперави и сорта Кульджинский в рамках проекта «Разработка диагностических тест-систем для выявления вирусов и вирионов экономически важных плодовых культур». Первое обнаружение ВаСЛВ в Казахстане было осуществлено в лаборатории молекулярной биологии, НИИ биологии и биотехнологии растений. Обнаружение ВАВ в Казахстане проводится в НИИ биологии и биотехнологии растений и в НИИ плодовоовощеводства. ВаСЛВ-1, -3, -4 относятся к роду *Ampelovirus*, ВаСЛВ -2 к роду *Closterovirus*, ВаСЛВ- 7 к роду *Velarivirus* [131-133]. Результаты филогенетического анализа показали, что вирусы ВаСЛВ- 1 и -3 распределяются в отдельный кластер от ВаСЛВ- 4 и его известных штаммов, которые образуют монофилетическую группу [72, р. 15, 134]. ВаСЛВ-3 и-1 имеют широкое распространение по всему миру [85, р. 220, 132, р. 1180, 135].

1.2.1 Вирус А винограда

Вирус А винограда может приводить к потерям, которые составляют 22% от урожая, собранного с инфицированного поля [136]. ВАВ вызывает синдром образование желобков у ствола Кober, который входит в комплексное заболевание бороздчатости древесины винограда, рисунок 4. Вирусная инфекция может носить бессимптомный характер, но при этом, вирус успешно реплицируется в клетках хозяина и передается здоровым растениям виноградника [137].



А) Симптомы заболевания, вызванного ВАВ, на растении сорта Мерлот; Б) Образование желобков у ствола винограда

Рисунок 4 – Симптомы ВАВ инфекции у растений винограда [1, р. 243]

В Германии в 2008 году было показано, что вирусная инфекция, вызванная ВАВ, достаточно часто встречается среди виноградников (46,9%), но при этом экономические потери от ВАВ являются незначительными [138].

В настоящий момент в базе данных NCBI находится последовательности геномов 12 изолятов ВАВ, выделенных из разных стран мира, геномы которых полностью секвенированы. 8 изолятов были выделены из южной Африки, 1 изолят из Бразилии, 1 изолят из Канады и 2 изолята из Италии. Молекулярная биология изолятов из Южной Африки (ЮА) достаточно хорошо изучена. Данные изоляты ВАВ способны вызывать 4 типа симптомов вышеописанного синдрома: 1, умеренное обесцвечивание жилок; 2, обесцвечивание жилок и хлороз; 3, обесцвечивание жилок, хлороз, скручивание верхних листьев растения; 4, обширный некроз [139]. По филогенетическому анализу нуклеотидных последовательностей всего генома, изоляты ЮА подразделяются на 3 группы (рисунок 5) [140], 2 группу формируют изоляты обладающие высокой патогенностью и вызывающие сильные поражения [141]. Группу 3 формируют изоляты с высокой генетической гетерогенностью внутри группы и вызывающие умеренные симптомы инфекции в растениях *Nicotiana benthamiana*. Кроме того, было выявлено, что генетическая однородность внутри групп составила 81.9- 93.5% и 70.3- 76.7% между группами [140, р. 108].

Представители рода *Vitis* являются единственными естественными хозяевами ВАВ, также возможно инфицирование индикаторных растений преимущественно рода *Nicotiana* методом механической инокуляции [142].

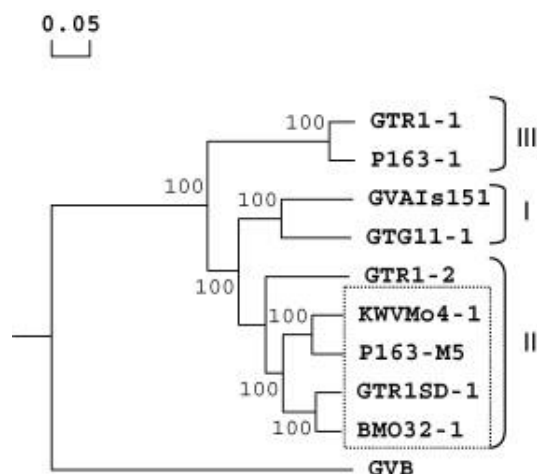


Рисунок 5 – Филогенетическое древо изолятов ВАВ из Южной Африки [140, р. 107]

Основными патологическими изменениями клетки при заражении ВАВ являются: образование агрегатов из вирусных частиц, которые могут приводить к заполнению всего клеточного пространства; утолщение стенки клетки за счет накопления каллозы; избыточная пролиферация и накопление цитоплазматических мембран; везикулярная инвагинация тонопласта [143]. Вирусная частица ВАВ имеет филаментозную форму, длина которой составляет около 800 нм, а диаметр 12 нм, рисунок 6.

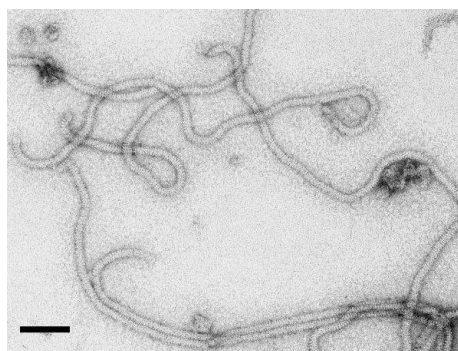


Рисунок 6 – Электронное изображение вирусных частиц ВАВ. Bar = 100 nm [144]

Вирион ВАВ включает 5% НК и 95% белка [145]. Геном ВАВ состоит из одноцепочечной (+) РНК, длина которого составляет 7,3- 7,4 кб. Геномная РНК на 5'- конце содержит метилированный кэп, а на 3'- конце поли -А хвост [146-147] и состоит из 5 ОРС, рисунок 7.



Рисунок 7 – Схематическое изображение организации генома ВАВ

ОРС 1 кодирует 194 кДа полипептид, который содержит консервативные мотивы белков, ассоциированных с репликацией генома (метилтрансфераза, РНК-геликаза, РНК-зависимая РНК-полимераза) [146-147]. Кроме того, было определено, что репликационный комплекс включает домен AlkB фермента, который участвует в репарации ДНК у эукариота [148-149]. Данный домен также был обнаружен у представителей *Sadwavirus* [150], *Potyvirus* [151], у некоторых представителей рода *Ampelovirus* [152]. Предполагается, что данный домен у вирусов способствует инфицированию многолетних растений [153]. В 2008 году был проведен функциональный анализ вирусных AlkB. Результаты анализа показали, что вирусный AlkB предпочтительнее работает с РНК, нежели с ДНК [153] и обладает Fe(II), 2-оксоглутарат зависимой демителазной активностью *in vitro* [155]. ОРС2 кодирует белок неизвестной функции и строения, предполагается, что данный белок участвует в распространении вируса с помощью естественных переносчиков [147, р. 419]. ОРС 3 кодирует белок передвижения вируса между клетками. Размер белка передвижения составляет 31 кДа. ОРС 4 кодирует капсидный белок размером 22 кДа [146, р. 19]. ОРС 5 кодирует 10 кДа белок (Р10), который является супрессором РНК – интерференции [156-157]. Результаты клонирования и экспрессии белка Р10, как супрессора, показали, что белок обладает низкой активностью. При его экспрессии в немодифицированном ВАВ, активность Р10 повышается в 1000 раз, в виду чего было выдвинуто предположение, что на активность супрессора положительно влияют дополнительные факторы ВАВ [158]. Вирус А винограда является флоэмным вирусом [159] и реплицируется в цитоплазме клеток хозяина.

1.3 Распространение вируса А винограда. Естественные переносчики вируса в природе

Вирус А винограда встречается на виноградниках всего мира. В ЮА ВАВ вызывает смертельные поражения таких сортов винограда, как Gamay, Malbec, Merlot, Shiraz и Voignier [160]. Рост молодых растений замедляется [161]. Способность к плодоношению значительно снижается по сравнению с незараженными растениями. В 1990 годах был проведен серологический анализ растений винограда, собранных на территориях коммерческих виноградниках в Тунисе, Йемене и Италии. В Тунисе, ВАВ был обнаружен в 50% растений выборки, при этом с сопутствующей вирусной инфекцией, вызванной кластеровирусами [162]. Результаты исследования растений винограда в Йемене показали, что ВАВ достаточно сильно распространен среди старых и самоукорененных растений [146, р. 20]. Результаты исследования виноградников на наличие ВАВ, в северной Италии, показали достаточно большой разброс зараженности от 4 до 97% растений выборки [163].

С помощью методов, основанных на полимеразной цепной реакции, были определены уровни зараженности коммерческих виноградников вирусами ВАВ и ВВВ в Тунисе [164], Бразилии [165], Испании [166], Японии [167], Хорватии [168], Иордании [169]. В Республике Казахстан ВАВ был обнаружен впервые в

2006 году в рамках проекта «Клонирование геномной РНК вируса А винограда, разработка системы детекции и создание резистентных трансгенных растений», шифр 01.01.06.01.P1. ВAB был обнаружен в образцах винограда, собранных на территории виноградников Алматинской области. Инфицированность виноградников варьировала от 20 до 50%. ВAB был обнаружен в сортах Саперави, Каберне Фран, Рислинг, Тайфи розовый. Обнаружение ВAB в Казахстане проводится в НИИ биологии и биотехнологии растений и в НИИ плодовоовощеводства. Проведенные исследования в Китае показали, что зараженность виноградников составляет 16,9 %, исследование проводилось на гибридах *V. vinifera* × *V. Labrusca* [170]. Проведенные исследования в Калифорнии привели к предположению, что *V. Californica* и его гибриды с *V. Vinifera* являются естественными резервуарами для ВAB и некоторых кластеровирусов [171].

Вирус А винограда распространен широко в природе благодаря способности передаваться путем прививки и с помощью естественных переносчиков. В 1983 году было показано в северной Италии, что мучнистые червецы участвуют в передаче ВAB от зараженных растений винограда здоровым, в переносе вирусов участвовали *Pseudococcus longispinus* [172]. В 1985 году было описано еще два природных переносчиков ВAB, *P. citri* и *Planococcus ficus* [173]. В 1989 году в Израиле подтвердили способность *Planococcus ficus* переносить ВAB [174]. 7-ми летнее исследование распространения вирусной инфекции, вызванной ВAB, на коммерческих виноградниках в Израиле показало, что распространение вируса сильно связано с распространением мучнистых червецов [175]. ВAB не способен размножаться в клетках природных переносчиков, достигает пищеварительного канала или остается на хоботке, где возможно происходить специфическое связывание, но не проникает в клетки переносчика [176-177]. Предполагается, что у вирусов ключевым белком во взаимодействии с переносчиком является капсидный белок [178]. Для ВAB, как было описано ранее, белок кодируемый ORC2 возможно также участвует во взаимодействии вируса с его природными переносчиками. Процессы проникновения вирусов растений в клетки хозяина и выход из них в большинстве случаев осуществляются с помощью естественных переносчиков. Известно небольшое количество вирусов растений, которые способны самостоятельно преодолевать клеточные барьеры, прежде всего клеточную стенку, для выхода из зараженного растения и инфицирования здорового [179].

1.4 Размножение вируса А винограда в клетках растений. Репликация и экспрессия генома

При проникновении ВAB в клетки хозяина, РНК геном служит мРНК для экспрессии ORC1 полипептида, который включает РНК-зависимую РНК полимеразу, геликазу, метилтрансферазу. В настоящий момент не известно, расщепляется данный полипептид или нет. Предполагается, что он функционирует путем активации того или иного домена [86, р. 80]. Репликация

вирусного генома осуществляется вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой и начинается с 3'-конца, который должен быть неповрежденным и включать базовый промотор [180-187]. Репликация генома ВАВ начинается с синтеза (–) РНК цепи на геномной (+) РНК цепи. На (–) РНК цепи синтезируется геномная (+) РНК цепь, которая в дальнейшем упаковывается в капсид. Данный тип репликации характерен для всех вирусов растений, содержащих одноцепочечный РНК геном с положительной полярностью. Репликативная форма, двуцепочечная РНК молекула, которая содержит (+) цепь геномной РНК и (–) цепь геномной РНК, в дальнейшем рассоединяется с помощью вирусной геликазы. Для экспрессии генома, поздних генов (гены, кодирующие белок передвижения и капсидный белок), ВАВ эксплуатирует стратегию субгеномных РНК [188]. Было обнаружено два набора субгеномных РНК: 5'- терминальные и 3'- терминальные, рисунок 8. 5'- терминальные сбРНК включают молекулы размерами 5,1; 5,5; 6,3 кб. 5,1- терминальная сбРНК включает всю ОРС1 последовательность, 5,5 - терминальная сбРНК включает ОРС1 последовательность и большую часть ОРС2 последовательности, 6,3 терминальная сбРНК состоит из ОРС1 и ОРС2 последовательностей, а также включает большую часть ОРС3 последовательности. С помощью 5'- терминальных сбРНК экспрессируется ОРС1, а также полипептид ОРС1 синтезируется с геномной РНК. 3'- терминальные сбРНК включают молекулы размерами 1,0; 1,8; 2,2 кб. 1,0 терминальная сбРНК соответствует ОРС4 и ОРС5 последовательностям, 1,8 сбРНК включает ОРС3, ОРС4 и ОРС5 последовательности, 2,2 кб сбРНК состоит из ОРС2, ОРС3, ОРС4 и ОРС5 последовательностей. Синтез белка, кодируемого ОРС2, осуществляется через 2,2 кб терминальную сбРНК. Экспрессия белка передвижения происходит с помощью 1,8 кб 3'- терминальной сбРНК.

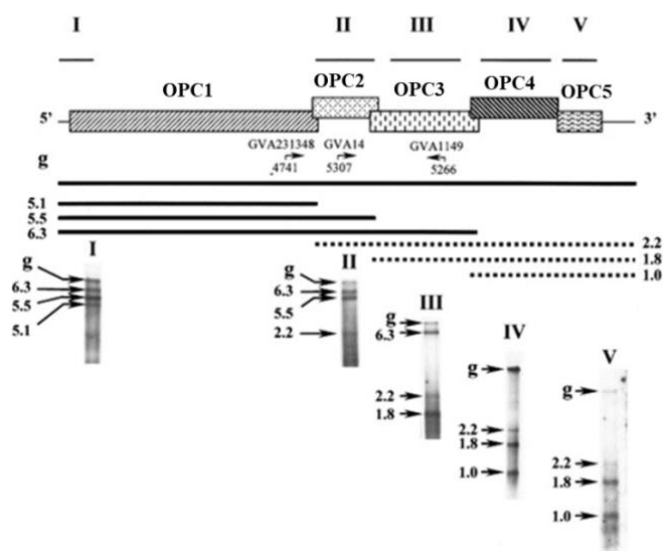


Рисунок 8 – Схематическое изображение 5'- и 3'- терминальных субгеномных РНК ВАВ [188, р. 437]

Соответственно, синтез капсидного белка происходит с помощью 1,0 кб 3'- терминальной сбРНК. При исследовании субгеномных РНК ВАВ не было обнаружено сбРНК для ОРС5, ввиду чего предполагается, что ОРС5 экспрессируется через би- или полицистронную мРНК. Транскрипция сбРНК осуществляется с помощью цис - действующих элементов или субгеномных промоторов, которые располагаются выше старт кодонов каждой ОРС на (–) цепях геномной или субгеномных РНК. Кроме того, были обнаружены (–) РНК цепи для каждой (+) цепи субгеномных РНК, которые служат мРНК.

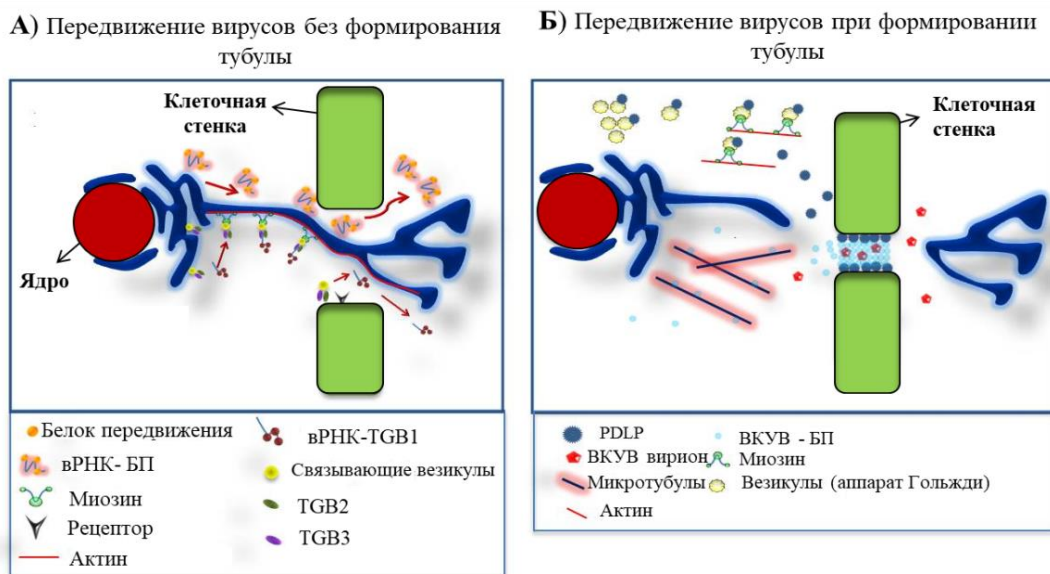
Предполагается, что субгеномные промоторы на (–) цепи геномной РНК служат промоторами для транскрипции 3'-терминальных сбРНК и терминаторами для синтеза геномной (+) цепи РНК, ввиду чего происходит высвобождение 5'- терминальных сбРНК.

На (+) цепи геномной РНК, данные цис - действующие элементы выступают в роли промоторов для транскрипции (–) цепей 5'- терминальных сбРНК и терминаторами синтеза (–) цепи геномной РНК, благодаря чему высвобождаются (–) цепи 3'- терминальных сбРНК.

1.5 Передвижение вируса А винограда по растению

После попадания вирионов ВАВ в клетки хозяина, с помощью механических повреждений или естественных переносчиков, вирус эксплуатирует синтетическую систему клеток хозяина для трансляции ранних белков (РНК-зависимая РНК- полимераз) и способствует дальнейшей репликации и экспрессии генома. Для заражения близлежащих клеток, а также системной инфекции, ВАВ передвигается между клетками растений с помощью плазмодесм, как и большинство вирусов растений. Основным препятствием для передвижения вирусов по плазмодесмам является ограничение размера вирусной частицы. Плазмодесмы участвуют в соединении соседних клеток и транспорте веществ необходимых для жизнедеятельности растения. В клеточных стенках соседних клеток формируются поры, через которые проходит плазмодесма или цитоплазматический канал. Плазмодесма включает плазмолемму, которая выстилает поры в клеточных стенках и является продолжением плазматической мембраны соседних клеток, десмотубулу - продолжение эндоплазматического ретикулума соседних клеток. Пространство между десмотубулой и плазмалеммой заполнено цитозолем. В настоящий момент известно, что плазмодесмы участвуют в таких важных процессах жизнедеятельности растений, как формирование корневых волосков [189], системная передача сигналов специфического иммунитета [190-193], транспорт метаболитов. Используя плазмодесмы для передвижения, вирусы растений тем самым избегают необходимость прохождения через клеточные стенки. Для успешного прохождения через плазмодесмы, вирусы растений в большинстве своем кодируют белок передвижения, а также капсидные белки, которые специфически могут связываться с элементами плазмодесм и/или вирусными белками передвижения и способствовать транспорту вирусных частиц.

Существуют несколько различных стратегий передвижения вирусов по плазмодесмам при участии вирусного белка передвижения, рисунок 9.



БП - белок передвижения; вРНК - вирусная РНК; PDLP - белки, плазмодесмы, необходимые для сборки вирусной тубулы

Рисунок 9 - Стратегии локального передвижения вирусов между клетками [193, р. 22]

Первая стратегия включает формирование тубулы из белков передвижения, данная тубула замещает десмотубулу плазмодесмы путем ее дестабилизации и разрушения [191, р.45]. Замена десмотубулы на тубулу из вирусных белков передвижения приводит к расширению просвета плазмодесмы и прохождению вирусных частиц. Как правило, данной стратегией пользуются вирусы, упакованные в капсид (бромовирусы, комовирусы, неповирусы). Предполагается, что ВАВ также использует данную стратегию для передвижения, экспериментальных данных по передвижению ВАВ через плазмодесмы на данный момент не имеется. ВАВ передвигается по плазмодесмам в упакованном виде, работы по «нокаутированию» гена, кодирующего капсидный белок, привели к неспособности вируса передвигаться по растению [192, р. 43]. Вторая стратегия передвижения вирусов растений между клетками заключается во взаимодействии вирусного генома с белком передвижения, который способствует его прохождению через плазмодесмы. В транспорте участвуют белки плазмодесмы, клеточные киназы и цитоскелет клетки. В ряде работ было показано, что происходит взаимодействие комплекса, включающего геномную РНК и белки передвижения, с цитоскелетом, который связан с пектинметилэстеразами (ПМЭ) клеточной стенки [193, р.25].

ВАВ является флоэмным вирусом и для системного распространения инфекции по всему растению от зараженного участка необходимо его

проникновение во флоэму. Для успешной системной инфекции вирусу необходимо пройти через клетки мезофилла (КМ), клетки склеренхимы, клетки паренхимы (КП), клетки-спутники (КС), а также клетки ситовидных трубок (КСТ), рисунок 10.

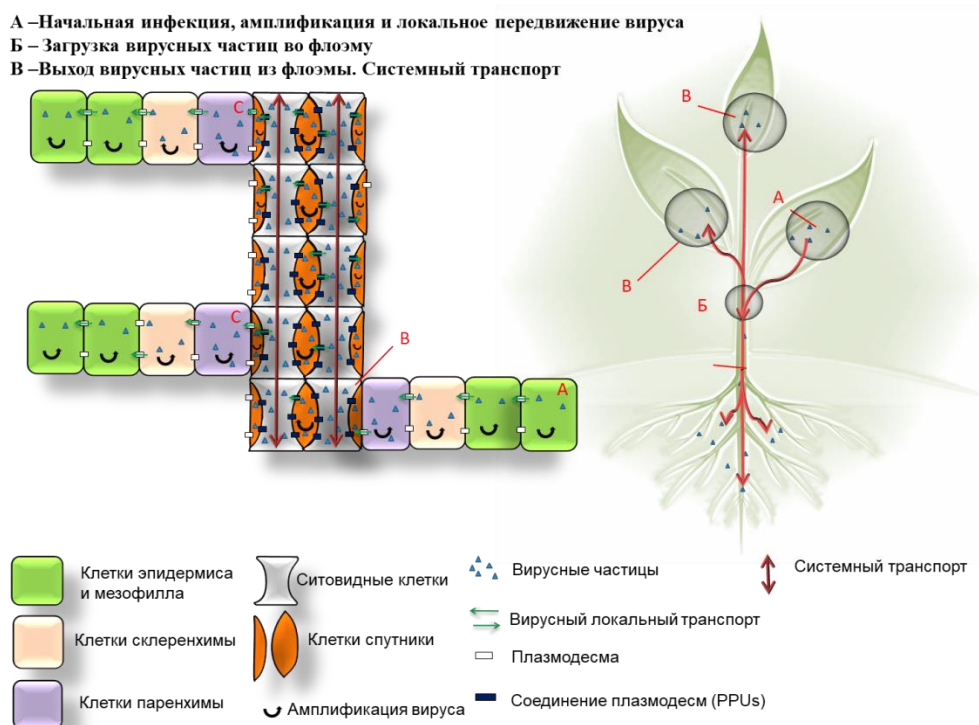


Рисунок 10 - Системное передвижение вирусов по растению флоэмным током [193, р. 23]

Локальный же транспорт происходит между соседними клетками одной и той же ткани, как правило, между клетками мезофилла или клетками эпидермиса. Как было отмечено в ряде работ, локальный транспорт по скорости протекания медленнее (5-15 мкм/ч), нежели системный транспорт (50-80 мм/ч), что вероятно связано с репликацией вируса в клетках [194].

Для прохождения тканевых барьеров при системном транспорте, вирусы растений могут использовать другие вирусные и клеточные компоненты по сравнению с компонентами при их локальном транспорте. Диаметр плазмодесм различается у разных типов клеток, что эволюционно привело к формированию различных стратегий системного вирусного транспорта. Эксперименты по выделению вирусных частиц, а также компонентов вирусов, показали, что концентрация вируса достаточно низкая в системных листьях. Ввиду чего было предположено, что срабатывает иммунная система растений, РНК-интерференция, либо прохождение вирусов через все тканевые барьеры является значимым ограничителем в системном транспорте. Для преодоления процессов РНК – интерференции, вирусы растений зачастую кодируют супрессоры, которые позволяют успешно преодолевать систему защиты растений и реплицироваться в клетках хозяина, таблица 1.

Таблица 1- Список супрессоров РНК-интерференции

Вид вируса	Геном вируса	Природный хозяин	Название супрессора
Вирус скручивания листьев томатов	ДНК	Томат, петунья, фасоль	C2
Вид вируса	Геном вируса	Природный хозяин	Название супрессора
Вирус желтухи свеклы	(+) РНК	Маревые	P21
Цитрусовый тристеа вирус	(+) РНК	Цитрусовые	P20, P23, CP
Вирус-2 скручивания листьев винограда	(+) РНК	Виноград	P24
Вирус хлороза томата	(+) РНК	Томат	P22, CP, CPm
Вирус мозаики огурца	(+) РНК	Широкий круг хозяев	2b
Вирус шарки сливы	(+) РНК	Косточковые	HC-Pro
Вирус Y картофеля	(+) РНК	Пасленовые	HC-Pro
Вирус мозаики тюльпанов	(+) РНК	Двудольные	HC-Pro
Вирус табачной мозаики	(+) РНК	Широкий круг	126K
Вирус мозаики томатов	(+) РНК	Пасленовые	126K
Вирус погремковости табака	(+) РНК	Широкий круг	16K
Вирус хлоротической пятнистости яблонь	(+) РНК	Яблоня	P50
Вирус А винограда	(+) РНК	Виноград	P10

ВАВ, как было отмечено ранее, кодирует P10 белок, который является супрессором РНК - интерференции и способствует распространению вируса по растению. Известными супрессорами РНК - интерференции вирусного происхождения являются: P14 (*Pothos latent aureusvirus*), P38 (*Turnip crinkle virus*), данные супрессоры предотвращают процессинг двухцепочечной РНК в малые интерферирующие РНК [195-196]. P25 (*Citrus tristeza virus*), P20 (*Citrus tristeza virus*) и P23 (*Citrus tristeza virus*) также являются изученными супрессорами РНК- интерференции. В ряде работ было отмечено, что P23 является локальным супрессором и обладает высокой активностью ингибирования РНК- интерференции [197]. P25 является капсидным белком *Citrus tristeza virus* и выполняет функции системного супрессора РНК – интерференции [198].

ВАВ после проникновения во флоэму с током ассимилятов выходит из нее и проникает в незараженные клетки растения. Выход из флоэмы требует прохождение вышеописанных тканевых барьеров. Некоторые вирусы растений, например, представитель рода *Luteovirus* - вирус скручивания листьев картофеля, не способен выходить из флоэмы, что вероятно связано с работой РНК - интерференции, либо с природной неспособностью преодолевать

тканевые барьеры [199]. Для успешного выхода вирусов из флоэмы, большое значение играют факторы растений, способствующие или препятствующие транспорту вирусных частиц. К таковым факторам растений относят: пектинметилэстеразу, глицин богатый белок, который индуцируется кадмием (cdiGRP). ПМЭ является необходимым фактором в выходе вирусных частиц из флоэмы, в то время как cdiGRP является ингибитор данного транспорта, как было показано для тобамовирусов [200-201].

1.6 Научное и практическое применение вирусов растений

В настоящее время, вирусы растений нашли широкое применение во множестве областях науки и техники, благодаря высокой инфекционной способности, сайт-специфической рекомбинации, высокому уровню амплификации и экспрессии генома, легкости генетических манипуляций с вирусным геномом, отсутствию способности амплификации в клетках животных [202]. Вирусы растений используются для изучения молекулярных процессов взаимодействия хозяина - патогена, молекулярных основ иммунитета растений, широкое применение вирусы получили также в изучении функциональной геномики растений за счет индицирования умалчивания генов (VIGS) [203-205]. VIGS система включает 3 основных этапа: 1 этап – это внесение в геном вируса интересующего гена, который должен быть выключен в растениях; 2 этап – инфицирование изучаемого растения; 3 этап – умалчивание нужного гена в растениях, данный процесс является защитным механизмом от вирусной инфекции. Имеются ряд вирусных VIGS векторов, которые были созданы с целью изучения функциональной генетики растений [206]. Данные вектора были разработаны на основе вирусов, заражающих семейство пасленовых [207]. Первый VIGS вектор был разработан на основе генома вируса мозаики табака с инсерцией короткой последовательности гена, кодирующего фитоин дезауразу [208]. VIGS векторы, основанные на геномах вирусов ВХК и ВТМ имеют ряд ограничений, к которым относится прежде всего неспособность заражать клетки меристемы, ограниченный круг хозяев [209]. Данные ограничения стало возможно преодолеть путем разработки VIGS вектора на основе генома вируса погремковости табака (ВПТ) [210-211]. Данный вектор был использован для изучения процессов цветения, формирования цветков, плодов, корней, метаболизма растений, развития растения, а также иммунитета растений [212-218]. VIGS система изучения функциональной геномики растений имеет ряд ограничений. Данные ограничения включают в первую очередь наличие природной устойчивости растений к определенным вирусам, что приводит к низкой эффективности умалчивания генов растений или же к отсутствию умалчивания вообще; транзистентная (временная) экспрессия вирусного генома и соответственно целевого гена; необходимость стандартизации процедуры VIGS для каждого вида растения [219]. Тем не менее, VIGS система является самым быстрым и эффективным способом определения функций генов и обнаружения новых генов растений.

Помимо научного применения, вирусы растений активно используются как генетические платформы для экспрессии гетерологичных белков в растениях для целей медицины, сельского хозяйства и т.д. В настоящий момент, с помощью вирусных векторов продуцируют в растениях такие важные белки, как производственные ферменты, биологически активные олигопептиды, иммуноглобулины, гормоны, вакцины, а также компоненты наночастиц для целей бионанотехнологии. Вектора на основе вирусов растений предоставляют возможность получать в большом количестве нужный белок за короткое время и без контаминации патогенами животных. Преимущества продукции рекомбинантных белков в растениях включают: быстрое масштабирование производства, отсутствие дорогих условий выращивания растений по сравнению с культивированием клеток животных, отсутствие общих патогенов у растений и животных. Получение рекомбинантных белков в растениях возможно и с помощью трансгенных растений, путем стабильной инсерции гетерологичного гена в геном растений. Использование трансгенных растений является первым методом в получении рекомбинантных белков в растениях, метод транзientной экспрессии с помощью вирусов растений был развит позже, но в настоящий момент является доминирующим. Такие крупные компании, как Icon Genetics, Mapp Biopharmaceutical, Fraunhofer Institute for Molecular Biotechnology, iBio, Caliber Biotherapeutics, PlantForm используют транзientную экспрессию (вирусные вектора) для получения гетерологичных белков в растениях [220]. Помимо продукции рекомбинантных белков в растениях, вирусные вектора могут быть использованы для защиты растений от фитопатогенов, а также для ускоренного отбора генов для целей селекции многолетних растений. Генетическое совершенствование сельскохозяйственных культур, путем внесения гетерологичных генов в геном, может занимать от 5 до 20 лет с незначительным улучшением сорта, использование вирусных векторов позволяет оценить результаты работы желаемых генов - кандидатов в разы быстрее [221].

1.6.1 Генетическая инженерия вирусных векторов

Вирусные вектора, на основе геномов вирусов растений, были разработаны как альтернатива трансгенным растениям для экспрессии рекомбинантных белков. Первые попытки внесения гетерологичных генов в растения с помощью вирусных векторов начались в 1980-х годах [222]. Первый созданный вектор основывался на ДНК геноме вируса мозаики цветной капусты. В настоящий момент, преобладают работы по созданию векторов, основанных на вирусах с одноцепочечным РНК геномом с положительной полярностью [223]. По способу разработки, вирусные вектора подразделяются на: вектора, основанные на полном геноме вируса; вектора, основанные на деконструктивном геноме вируса; вектора для презентации эпитопов. Несмотря на большое количество работ, посвященных разработке векторов на основе геномов различных вирусов растений, только некоторые виды вирусов могут быть использованы как платформы для экспрессии рекомбинантных

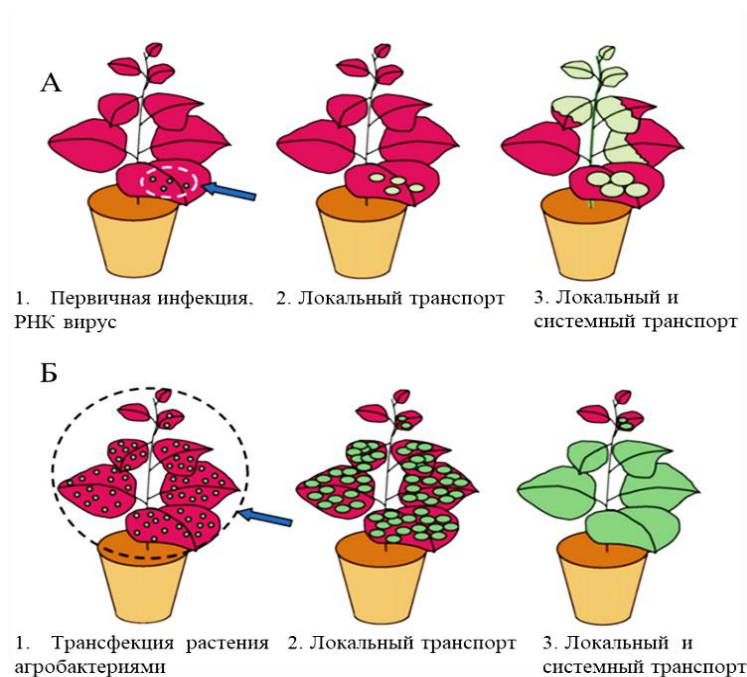
белков. Основными причинами непригодности вирусов растений для разработки векторов являются: нестабильность вектора, нарушение процессов репликации генома, пониженный уровень транскрипции гетерологичного гена, нарушение процессов передвижения вируса по растению, нарушения процесса упаковывания генома в капсид, экспрессия белков небольшого размера. Первые работы по созданию векторов заключались во внесении дополнительного гетерологичного гена в вирусный геном, без удаления участков генома и с сохранением функциональности. Данные вектора, основанные на полном геноме вируса и относятся к векторам первого поколения. Ввиду того, что инфекционная способность вируса не является 100%, а также работа иммунной системы растений участвует в ограничении распространения вирусов и в снижении экспрессии вирусных генов, появилась необходимость в разработке более эффективных векторов. Для повышения уровня экспрессии рекомбинантных белков были разработаны вектора второго поколения, деконструктивные вектора. Вектора второго поколения разрабатываются путем замены генов вирусов на гетерологичный ген, а также возможно удаление вирусных генов, которые не являются важными в экспрессии рекомбинантных белков. Технология, которая включает экспрессию рекомбинантного белка с помощью вирусного вектора и доставку вирусного вектора в растение с помощью агробактерий носит название Magnifection [224]. Вирусные вектора для презентации антигенов широко используются в разработке вакцин. Важный эпитоп антигена экспрессируется совместно с капсидным белком вируса как один полипептид, при этом сохраняется конформация белка и возможна сборка вирусной частицы. Эпитоп при этом располагается на поверхности вирусной частицы [225]. В данном случае, рекомбинантная собранная вирусная частица используется как вакцина. Основная проблема разработки векторов для презентации антигенов заключается в размере эпитопа, зачастую размер составляет не более 25 - 37 аминокислотных остатков [226-229]. В 2017 году был разработан вектор на основе вируса мозаики бамбука, с помощью которого был экспрессирован эпитоп антигена вируса энцефалита и размер эпитопа составил 111 аминокислотных остатков [230].

1.6.1.1 Вирусные вектора первого поколения

Вирусные вектора первого поколения участвуют в экспрессии всех вирусных белков и дополнительного рекомбинантного белка. Функциональная целостность вируса при этом сохраняется. Вирус способен реплицироваться, упаковываться в капсид, передвигаться по растению, как дикий немодифицированный тип [224, р. 138]. Гетерологичный белок экспрессируется благодаря дублированному вирусному промотору (в основном используется субгеномный промотор капсидного белка) или сшивается с вирусными белками с дальнейшим расщеплением от полипептида. Вирусный вектор может доставляться в клетки растений с помощью механической инокуляции, ДНК вектора совместно с абразивным материалом (карбид кремния) наносится на листья индикаторного растения и слегка

втирается, данный метод доставки возможен для вирусов переносимых механической инокуляцией. Для получения рекомбинантных белков в большом количестве используют устройства для распыления вирусного вектора совместно с абразивным материалом на большие площади, где произрастают растения. В зависимости от природы вируса и индикаторного растения, наибольшая концентрация гетерологичного белка достигается в течении 2-3 недель. Кроме того, доставка вирусного вектора возможна путем внесения ДНК копии репликона вируса в бинарный вектор с последующей доставкой в индикаторное растение с помощью агробактерий [231]. Данный метод признан наиболее эффективным и быстрым. Вектора первого поколения или вектора, основанные на полном геноме вируса, успешно использовались для экспрессии эпитопов различных антигенов на поверхности вирусной частицы. Хорошо изученным вирусом для разработки векторов является вирус табачной мозаики, удалось разработать вектор, на основе полного генома ВТМ, с инсерцией ЗФБ гена, экспрессия при этом ЗФБ составила 10% от общего количества растворимого белка. Уровень экспрессии ЗФБ соответствовал уровню экспрессии КБ вируса табачной мозаики [232, 233]. Разработанный вектор, на основе полного генома ВАВ, был использован для экспрессии ЗФБ в табаке, но авторами было отмечено низкое содержание белка в листьях с системной инфекцией [234, 235]. Внесение гетерологичного гена было осуществлено под дублицированный субгеномный промотор ОРС2, в виду чего вектор оказался нестабильным с потерей рекомбинантного гена. Для преодоления генетической нестабильности, авторы внесли рекомбинантный ген под субгеномный промотор ОРС2, взятого из другого изолята ВАВ.

В настоящий момент, с помощью вирусных векторов первого поколения максимально было получено 1 г рекомбинантного белка на 1 кг свежей биомассы растений. Размер гетерологичного гена для векторов первого поколения не превышает 1,7 кб. Основными недостатками векторов на основе полного генома вирусов являются: низкая экспрессия рекомбинантного белка, низкая природная инфекционная способность вирусов, тканеспецифичное системное передвижение некоторых вирусов, длительность системной инфекции, работа иммунной системы растений. Доставка вирусного вектора в растение с помощью агробактерий позволяет в разы увеличить эффективность трансфекции, снизить время экспрессии рекомбинантного белка. В ряде работ было показано, что неинтегрированная Т-ДНК в геном растения, несущая соответствующие регуляторные участки и контролируемый ими рекомбинантный вирусный геном, успешно транскрибируется и транслируется транзистентно. В виду чего, время для формирования РНК репликона вируса и экспрессии рекомбинантного белка сокращается. Агроинфильтрация всего растения повышает выход рекомбинантного белка, так как вирусы не способны заразить равномерно все растение, рисунок 11.



А) Инфильтрация нижних листьев, самостоятельное распространение вируса по растению (вектора первого поколения). Б) Инфильтрация всего растения (вектора первого и второго поколения)

Рисунок 11 - Иллюстрация распространения вируса по растению при агроинфильтрации единичных листьев или всего растения [224, р. 136]

Недостатки вирусных векторов первого поколения, в особенности низкая экспрессия рекомбинантного белка, которая не отличалась от экспрессии гетерологичных белков трансгенными растениями, привели к разработке более эффективных векторов или векторов второго поколения [236].

1.6.1.2 Вирусные вектора второго поколения

Вектора второго поколения или вектора, основанные на деконструктивном геноме вируса, позволили в разы повысить эффективность экспрессии рекомбинантного белка за короткое время. Данные вирусные вектора содержат только необходимые компоненты вирусного происхождения для экспрессии рекомбинантного белка, а именно вирусные белки, участвующие в транскрипции и репликации вирусного генома. Вирусы способны с высокой эффективностью амплифицироваться в клетках растений. Вирусные компоненты, отвечающие за упаковку генома, системное передвижение вируса по растению удаляются. Ввиду чего, вирус не способен к системному транспорту, для максимального распространения вируса по растению используют агробактерии, вирусный вектор доставляется с помощью агробактерий во все растение. Эффективность трансформации клеток растений с помощью агробактерий намного выше, нежели природные способности вируса вызывать системную и первичную инфекцию. Гетерологичный ген, в большинстве случаев, располагают под контроль субгеномного промотора

капсидного белка, так как серологические исследования показали, что количество капсидного белка больше всего накапливается при вирусной инфекции. Экспрессия капсидного белка в векторах первого поколения приводит к снижению экспрессии рекомбинантного белка, что связано, в первую очередь, с конкуренцией за ресурсы [224, р. 135]. Доставка вирусного вектора с помощью агробактерий во все растение может быть осуществлена путем агроинфильтрации или вакуумной инфильтрации. Объединение преимуществ трех биологических систем в экспрессии рекомбинантных белков в растениях носит название комплексной технологии. Комплексная технология включает вирусную способность с высокой эффективностью амплифицироваться в клетках растений, агробактериальную способность эффективно трансформировать клетки растений и способность растений осуществлять постраницационные модификации гетерологичных белков [224, р. 136]. В настоящий момент, успешно разработаны деконструктивные вектора на основе геномов ВХК [237], вируса желтой мозаики фасоли с экспрессией рекомбинантного белка в 1 мг на 1 г сырой массы листьев [238], ВТМ, вируса мозаики вигны. Эффективность экспрессии рекомбинантных белков в растениях с помощью деконструктивных векторов может достигать до 5 г на 1 кг сырой массы листьев растений. Ввиду отсутствия части генома, в деконструктивных вирусных векторах могут быть экспрессированы рекомбинантные белки массой до 80 кДа.

1.6.2 Методы создания векторов для мультигенной экспрессии

Совместная экспрессия нескольких гетерологичных белков в растениях с помощью одного вирусного вектора дает возможность получать комплексные белки для целей медицины, а также для изучения таких важных процессов, как метаболизм клеток, РНК-интерференции, взаимодействия хозяин-патоген, передвижения веществ по растению [239, 240]. Вектора для мультигенной экспрессии разрабатываются путем внесения множественных промоторов, протеиназных доменов, сайтов внутренней посадки рибосом, саморазрезающихся 2А последовательностей, а также путем сшивания гетерологичных белков с вирусными белками [239, р. 5]. Экспрессия гетерологичного белка совместно с вирусным белком, как единого полипротеина, применима в случае разработки векторов для презентации эпитопов антигенов при получении вакцин. Кроме того, данная стратегия пригодна для «пришивания» репортерных белков для визуализации исследуемого белка. Внесение протеиназных доменов между генами приводит к постраницационному разрезанию синтезированного полипротеина с помощью цис- или транс-протеиназ. Цис-протеиназы используются в том случае, когда вирусный геном содержит протеиназы и использует протеолитический процессинг в экспрессии генома. В данном случае протеиназные домены вносятся между генами и возможна мультигенная экспрессия. Кроме того, возможно внесение протеиназы в вирусный вектор и соответствующих протеиназных доменов между генами. Примерами вирусных векторов для

экспрессии гетерологичных генов с помощью протеиназных доменов являются вектора, разработанные на основе вируса гравировки табака [241, 242]. Кроме того, был разработан вектор с внесением 2А протеиназы риновируса (HRV14) [243] и гетерологичного гена, который был расположен на N-конце протеиназы и в рамке считывания с ней. Результаты экспрессии в растениях показали, что полипротеин успешно разрезается в процессе трансляции с помощью протеиназы, доменом разрезания служит N-конец фермента. Успешная экспрессия была возможна только в клетках растений и бактерий, в клетках животного происхождения накопление большого количества 2А протеиназы вызывало токсичный эффект. Клонирование протеиназ вирусного происхождения в вектора для протеолитического процессинга гетерологичных белков приводит к накоплению в больших количествах протеиназ, которые могут быть токсичными для клеток растений или животных. Также известны работы с использованием трнс-протеиназ, в данном случае протеиназа растения успешно пострансляционно разъединяла два белка, синтезированных как единый полипротеин с помощью спейсера из металлотионеин - подобного белка [244]. Использование транс- протеиназ дает возможность конструировать вектора на основе вирусов, которые не несут в геноме протеиназы и не вносят дополнительный ген протеиназы в вектор, но транс- протеиназы малоэффективны, протеолитический процессинг осуществляется не у всех полипротеинов. Фурины являются еще одной альтернативой использования транс- протеиназ при разработке мультигенных векторов для получения рекомбинантных белков в клетках животного происхождения. Главным недостатком протеолитической стратегии экспрессии рекомбинантных белков является низкая концентрация белка и неравномерная экспрессия генов, расположенных до и после протеиназного домена.

Использование отдельных промоторов для каждой ОРС приводит к индивидуальной транскрипции желаемых гетерологичных генов. Известны вектора на основе геномов ВТМ, ВАВ, ВХК и так далее, экспрессия рекомбинантных белков в которых осуществлялась за счет дополнительных или дублицированных промоторов. Дубликации промоторов РНК-содержащих вирусов приводит к нестабильности вектора, а именно к потере трансгена путем рекомбинации. Проблемы с нестабильными векторами успешно решаются путем клонирования внутренних промоторов из филогенетически близких вирусов или из других изолятов данного вида вируса [234, р. 229]. Главными недостатками использования внутренних или субгеномных промоторов при разработке векторов является нестабильность векторов, умалчивание рекомбинантных генов, низкий уровень транскрипции гетерологичного гена, интерференция между генами при мультигенной экспрессии, изменения эффективности транскрипции при смене индикаторного растения [245].

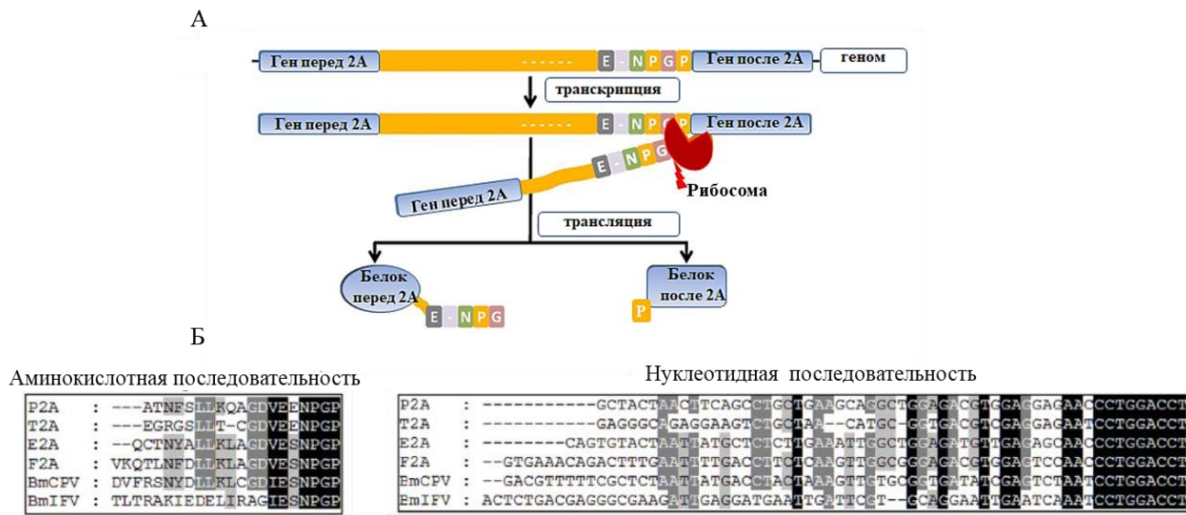
1.6.2.1 Участки внутренней посадки рибосом

Участки внутренней посадки рибосом или IRES (internal ribosome entry site) используются уже более 10 лет для мультигенной экспрессии в векторах. Трансляция осуществляется кэп-независимым путем и используется разными вирусами, в том числе пикарновирусами, в экспрессии генома [246]. Впервые IRES были обнаружены у полиовирусов и вируса энцефаломиокардита (ВЭМ) с последующим применением в разработке векторов [247]. Клонирование участка внутренней посадки рибосомы между двумя ОРС позволяет транслировать белок, ОРС которого расположена после IRES, путем связывания IRES с рибосомой. Кроме IRES вирусного происхождения, также были обнаружены IRES эукариот [248]. Экспрессия белков с помощью IRES особенно актуальна в случае ингибирования кэп-зависимой трансляции при клеточном стрессе. С помощью IRES из вируса табачной мозаики крестоцветных было успешно экспрессировано одновременно несколько рекомбинантных белков в *Nicotiana benthamiana* [249]. Ввиду наличия большого разнообразия IRES, были проведены эксперименты с исследованием разных IRES при экспрессии поверхностных белков CD70 и CD80 [250]. Результаты исследования показали, что практически во всех случаях, трансляция белков, расположенных после участков внутренней посадки рибосом хуже, нежели трансляция белков, расположенных перед IRES [251]. Данные различия в экспрессии белков до и после участков, предположительно связаны с тем, что факторы транскрипции наиболее эффективно связываются с 5'-кэпом, нежели с IRES. Кроме того, было показано, что эффективность связывания факторов транскрипции с IRES зависит от типа клеток [252]. Эффективность экспрессии белка, ген которого расположен после IRES, может составлять только 10 - 50% от экспрессии белка, ген которого расположен до IRES. При этом эффективность транскрипции белка не зависит от природы гена, так как один и тот же ген был расположен до и после IRES. Еще одним недостатком использования IRES является их размер, который составляет около 500 п.н, вирусные вектора с ограниченной генетической емкостью не могут быть использованы в разработке мультигенных векторов путем внесения нескольких IRES между рекомбинантными генами [253]. Кроме того, некоторые IRES, в том числе IRES из вируса гепатита С, требуют дополнительных нуклеотидных последовательностей для максимальной активности [254]. В ряде работ было показано, что возможна потеря гетерологичного гена из-за рекомбинации при использовании нескольких IRES в одном векторе. Сочетание IRES из ВЭМ и пикорнавирусов, из ВЭМ и полиовирусов, из ВЭМ, вируса гепатита С и пикорнавирусов было успешно использовано для мультигенной экспрессии. Тем не менее, при использовании любых IRES сохраняется проблема эквимоллярной экспрессии рекомбинантных белков.

1.6.2.2 2А пептиды

В настоящий момент, наиболее перспективным способом конструирования мультигенных векторов является использование

последовательностей, кодирующих 2А пептиды, между рекомбинантными генами. 2А пептиды обладают маленьким размером (19-22, а.о) и высокой процессивной активностью. Пептиды впервые были обнаружены у пикорнавирусов. В настоящий момент известно большое разнообразие 2А пептидов из разных вирусов, рисунок 12.



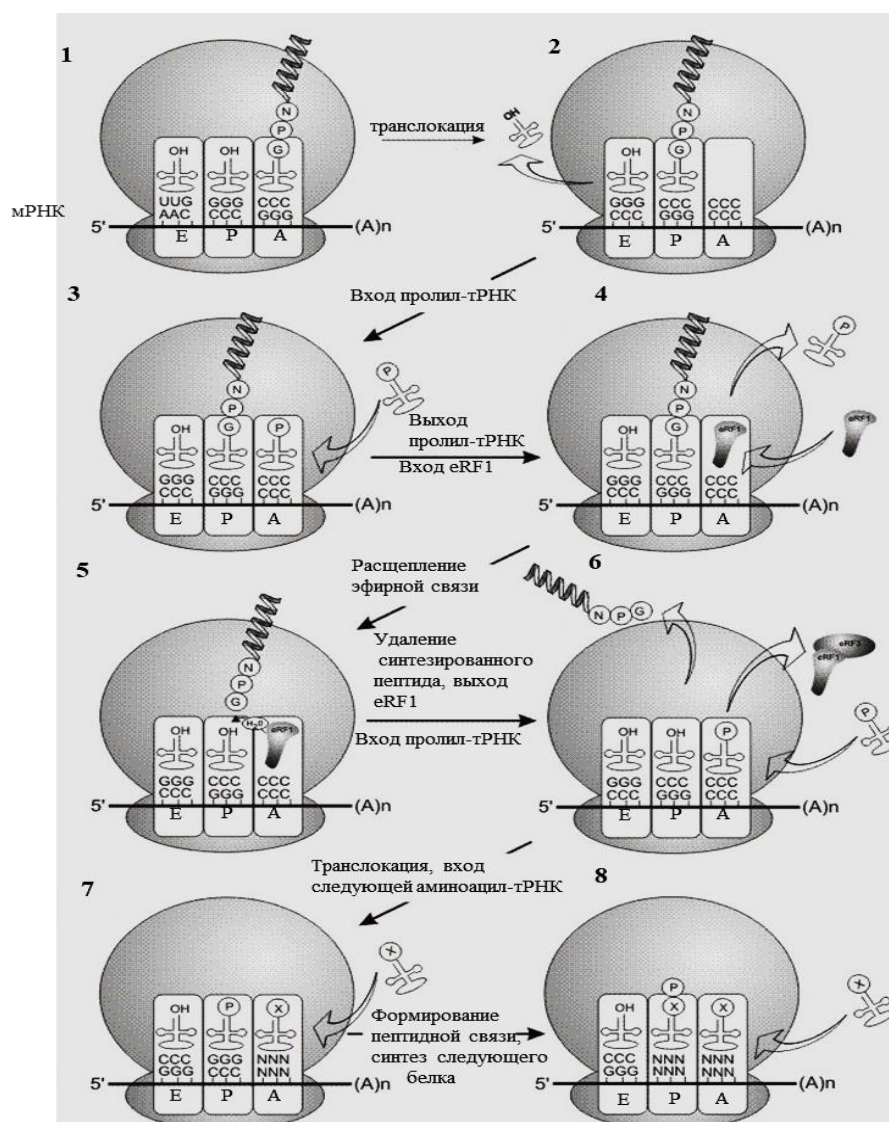
А) Механизм расщепления двух белков, между которыми расположена 2А последовательность. Б) Нуклеотидные и аминокислотные последовательности известных 2А-пептидов

Рисунок 12 – Схематическое изображение механизма разделения белков с помощью 2А пептидов [255, р. 2]

В создании мультигенных векторов активно используются последовательности 2А пептидов из таких вирусов, как свиной тековир-1 (2А последовательность носит название P2А), thosea asigna вирус (2А-T2А), вирус ринита лошадей (2А-E2А), вирус цитоплазматического полиедроза (2А-BmCPV 2А) и flacherie вирус (2А-BmIFV 2А) [255]. Помимо маленького размера, одним из главных преимуществ использования 2А пептидов в мультигенных векторах является эквимоллярная экспрессия рекомбинантных генов, расположенных как до 2А последовательностей, так и после.

Наиболее хорошо изученными являются 2А пептиды из пикорнавирусов. Экспрессия генома у большинства пикорнавирусов происходит путем синтеза одного полипептида, кодируемого единой ОРС. При этом, белки 1D и 2В разделяются с помощью 2А пептидов, расположенных между ними. Разделение происходит в процессе трансляции и не требует наличия дополнительных вирусных протеаз.

Котрансляционно происходит остановка формирования пептидной связи между С-концевым глицином 2А и пролином 2В белка, не влияя на синтез 2В белка, рисунок 13.



1-2) Транслокация рибосомы по мРНК, белок с С-концевым участком (-ESNPG-) 2А пептида переносится в Р-сайт рибосомы; 3-4) Вход пролил-тРНК в А-сайт, ингибирование разрыва эфирной связи между 2А пептидом и тРНК(глицин). Не происходит формирование пептидной связи между пролином и глицином. В следствии чего, происходит выход пролил-тРНК и вход фактора eRF1 в А-сайт; 5-6) Расщепление эфирной связи между 2А пептидом и тРНК(глицин) с помощью eRF1, происходит выход из рибосомы синтезированного белка с 2А пептидом на С-конце. Выход eRF1 и вход пролил-тРНК в А-сайт. 7-8) Продолжение синтеза белка, расположенного после 2А последовательности.

Рисунок 13 - Изображение механизма трансляции с участием 2А саморазрезающихся пептидов [256, р. 73]

Предполагаемым механизмом остановки формирования пептидной связи является задержка С-концевого участка (-ESNPG-) 2А пептида пептидил-трансферазным центром рибосомы. Данная задержка ингибирует разрыв эфирной связи между 2А пептидом и т-РНК(глицин) и соответственно перенос растущего пептида на пролил-т-РНК в А сайт рибосомы, в итоге трансляция останавливается [256-257].

После высвобождения синтезированного белка с помощью факторов eRF1 и eRF3, синтез последующего белка после 2А пептида продолжается и эффективность синтеза не снижается [258]. Препятствием в использовании 2А пептидов для мультигенной экспрессии может послужить остаток пептида на С-конце рекомбинантного белка, так как после разрезания в процессе трансляции вся последовательность 2А пептида, кроме последнего пролина, остается на С-конце предшествующего белка. Последний пролин остается на N-конце последующего белка [259-261]. Подобные аминокислотные остатки могут сказаться на конформации белка или на его активности, кроме того в случае специфичных взаимодействий концевых участков рекомбинантных белков в белок-белковых взаимодействиях вносятся дополнительные сайты для удаления 2А пептидов с помощью протеаз. Внесение последовательности - SNAADEVAT- из садового Бальзамина перед 2А пептидом позволили эффективно удалить 2А пептид от С-конца рекомбинантного белка с помощью эндогенных протеаз при экспрессии в *Arabidopsis thaliana* [262-264].

Тем не менее, остатки 2А пептидов на С-конце могут быть использованы для анализа экспрессии белков, которые различаются всего одной мутацией, путем серологических методов при использовании антител для 2А пептида [265]. В настоящий момент известно, что дополнительный пролин на N-конце последующего белка, не влияет на его активность.

1.6.3 Вирусные вектора в производстве рекомбинантных белков в растениях

В настоящий момент хорошо известными и широко используемыми биологическими системами для производства рекомбинантных белков являются: бактериальные клетки (*Escherichia coli*), дрожжи, клетки животного и растительного происхождения. В настоящий момент, клетки растительного происхождения являются наиболее актуальной системой производства гетерологичных белков [266-267]. Преимущества производства белка в растениях заключается в следующем: отсутствие общих патогенов у растений и животных; посттрансляционная модификация белка; быстрота масштабирования производства и дешевизна культивирования растений по сравнению с клетками животных; получение большого количества рекомбинантного белка за короткое время. Методы производства рекомбинантных белков растений, такие как создание трансгенных растений, трансформация хлоропластов, уступили место методу транзientной экспрессии белка в растениях, который стал возможен благодаря разработке векторов на основе вирусов растений. На основе геномов разных видов вирусов, относящихся к 7 родам, были разработаны вектора. Разработка векторов не прекращается и по сей день, так как главная цель в инженерии векторов заключается в разработке более эффективного и стабильного вектора для экспрессии рекомбинантного белка в больших количествах. С помощью транзientной экспрессии в растениях возможно получение таких важных белков как: антитела, пептидные гормоны, ферменты различного назначения, антигены, интерфероны и так далее. Первые вектора

для экспрессии гетерологичных белков основывались на двухцепочечном геноме вируса мозаики цветной капусты. Но, главная проблема в использовании таких векторов заключалась в ограниченном размере рекомбинантного гена, который может быть внесен в геном вируса [223, р. 370]. Большой прорыв в инженерии векторов был совершен с изучением механизма обратной транскрипции, с помощью которого возможно стало получать ДНК копии геномов РНК-содержащих вирусов. Вторым прорывом стало использование агробактерий для доставки вирусных векторов в клетки растений. До использования агробактерий, вирусные вектора доставлялись либо методом механической инокуляции, либо методом ядерной трансфекции. Кроме того, агроинфекция позволила доставлять вектора, на основе вирусов, которые не способны распространяться методом механической инокуляции и в природе распространяются с помощью естественных переносчиков. Первую успешную экспрессию рекомбинантного белка в растениях удалось получить с помощью вектора основанного на геноме ВМЦК. Данный вирусный вектор был разработан путем замены гена капсидного белка на гетерологичный ген. Путем замены капсидного белка на рекомбинантный, были разработаны вектора на основе геномов ВМТ и вируса кустистой карликовости томатов [5, р. 160]. Вирусный вектор, на основе генома ВМТ с заменой капсидного белка, был использован в экспрессии гетерологичного белка «сшитого» с лихеназой, что позволило легко очистить белок при высоких температурах. При экспрессии рекомбинантных белков в растениях, с помощью векторов, основанных на полном геноме вирусов, наиболее хорошо изученными являются вектора, основанные на ВТМ и ВХК. С помощью вектора, на основе генома ВТМ, были экспрессированы одноцепочечные переменные фрагменты антител человека для лечения неходжкинской лимфомы [268]. Для лечения вирусного трансмиссивного гастрэнтерита, были экспрессированы в растениях малые иммунные белки одноцепочечных переменных фрагментов антител с помощью вектора на основе генома ВХК [269]. Кроме того, были экспрессированы полные молекулы антител, иммуноглобулин А, с помощью двух векторов (один вектор содержит ген легкой цепи, другой вектор содержит ген тяжелой цепи) и последующей их коагроинfiltrацией растения. Использование одного и того же вектора для внесения разных гетерологичных генов, к примеру, один вектор содержит ген, кодирующий легкую цепь антитела, а второй вектор содержит ген тяжелой цепи, может привести к неравномерной экспрессии белков, рекомбинации и умалчиванию рекомбинантного гена. Для решения данных проблем разрабатывают неконкурирующие вектора для эквивалентной экспрессии белка, рекомбинантные гены вносятся в вектора, основанные на геномах разных вирусов. Известными неконкурирующими векторами являются векторы на основе геномов ВТМ и ВХК, с помощью которых были получены целые молекулы антител с эффективностью экспрессии в 5 г на 1 кг свежей массы за несколько недель [220, р. 170]. С помощью транзientной экспрессии рекомбинантных белков в растениях были получены: 1.2 г/кг СБ –

соматотропин; 5.1 г/ СБ – интерферон альфа; 5.4 г/ кг СБ – различные бактериальные антигены; 0.3-1.0 г/кг СБ – апротинин, 2.0 г/кг СБ – тауматин, 2.5 г/кг СБ – гриффитзин.

Широко используемым растением для производства гетерологичного белка является *Nicotiana benthamiana* [270]. Растение очень чувствительно к различным вирусам, в частности из-за дефектной формы РНК-зависимой РНК-полимеразы [271]. Данная повышенная чувствительность позволяет вирусам с высокой эффективностью реплицироваться в клетках растения и способствовать производству рекомбинантного белка в больших количествах. Кроме того, растение не используется в производстве пищевых или кормовых продуктов, что снижает риск попадания рекомбинантных белков медицинского назначения в продукты питания [272].

1.6.3.1 Комплексная технология получения рекомбинантных белков в растениях

В настоящий момент, комплексная технология является наиболее успешной и широко используемой для получения рекомбинантных белков в растениях в производственных масштабах. Данная технология объединяет преимущества трех биологических систем. Комплексная технология включает вирусную способность с высокой эффективностью амплифицироваться в клетках растений, агробактериальную способность эффективно трансформировать клетки растений и способность растений осуществлять постраницационные модификации гетерологичных белков [224, р. 138]. Вирусный вектор, который содержит гетерологичный ген, доставляется в растение с помощью агробактерий, при этом агроинфекции подвергается все растение методом вакуумной инфильтрации или агрораспыления. Комплексная технология подразумевает использование деконструктивных векторов или векторов неспособных самостоятельно системно распространяться в растениях. С помощью комплексной технологии в растениях были экспрессированы более 50 рекомбинантных белков разного назначения [224, р. 140]. Комплексная технология, известная как торговая марка MagnICON, является запатентованным методом компании Icon Genetics (Германия). В настоящий момент Icon Genetics является владельцем компании Nomad Bioscience, которая занимается производством рекомбинантных белков в растениях. Для тестирования новой конструкции и анализа экспрессии рекомбинантного белка используется несколько растений, что позволяет оптимизировать процесс для каждого гетерологичного белка. В зависимости от вирусного вектора, растения, а также оптической плотности агробактерий, рекомбинантные белки могут быть получены в течении 4-10 дней с максимальным выходом в 5 г на кг СБ. С помощью вирусных векторов нарушаются нормальные процессы синтеза белка в растительных клетках. Через 10-14 дней после агроинфицирования, рибулозобифосфаткарбоксилаза, белок в наибольшем количестве находящийся в листьях, исчезает или находится в следовых количествах, при этом эффективность экспрессии рекомбинантного белка составляет 80% общего

растворимого белка листьев. Комплексная технология представляет собой малозатратный метод для получения рекомбинантных белков. Приготовление большого количества растений и агробактерий обходится достаточно дешево. Получение 1 г грубого рекомбинантного белка на кг СБ составляет менее 1 доллара, затраты на очистку белка в соответствии с международными стандартами (GMP) составляют 50 долларов на 1г белка. Комплексная технология пригодна для получения как нейтральных, так и высокотоксичных белков. С помощью данной технологии получены такие белки, как гормоны, антитела, бактериальные и вирусные антигены, цитокины. Процесс получения рекомбинантных белков осуществляется в теплицах, и выход составляет на гектар растений 500 кг рекомбинантных белков за год. Для получения такого же количества белка в трансгенных растениях или при использовании векторов первого поколения потребуется в 1000 раз больше площади с растениями.

С помощью магнифекш технологии компанией Nomad Bioscience были получены такие белки, как мини-инсулин, человеческий интерферон альфа, гриффитзин. Свыше 40 иммуноглобулинов G против неходжкинской лимфомы, тауматин, одноцепочечные вариабельные фрагменты различных антител были получены компанией Icon Genetics [220, p. 175]. Векторы для экспрессии вышеуказанных рекомбинантных белков были разработаны на основе геномов ВТМ и ВХК.

1.6.4 Вирусные вектора для производства комплексных белков

Для получения в растениях функциональных рекомбинантных белков большого размера, более 120 кДа, необходимы: правильный фолдинг белка, соответствующий комплексный процессинг (к примеру, в случае геммаглутинина вируса гриппа птиц), правильное формирование вирусоподобных частиц, удаление сигнальных и транзитных пептидов от гетеролгичного белка. Полученные комплексные белки в растениях сохраняют необходимую активность: антигены, при тестировании на животных, обладают соответствующей иммуногенностью; антитела способны распознавать специфичные для них антигены; ферменты обладают энзиматической активностью. Одними из важных и комплексных белков являются антитела, потребность в которых возрастает ежегодно. Коммерческое производство антител позволит осуществлять лечение многих заболеваний. Основными проблемами в производстве антител является несоблюдение одного из трех правил: возможность индустриализации; безопасность; эффективность. Процесс получения антител в растениях с помощью транзientной экспрессии, основанной на вирусных векторах, соответствует вышеописанным правилам. В настоящий момент, моноклональные антитела в производственных масштабах получают такие компании, как Kentucky BioProcessing, Icon Genetics и Fraunhofer институт. Первые функциональные антитела были получены в растениях при использовании комплексной технологии (MagnICON). Ввиду того, что растения в процессе гликозилирования рекомбинантного белка добавляют ксилозу (не обнаружена в клетках животного происхождения) и

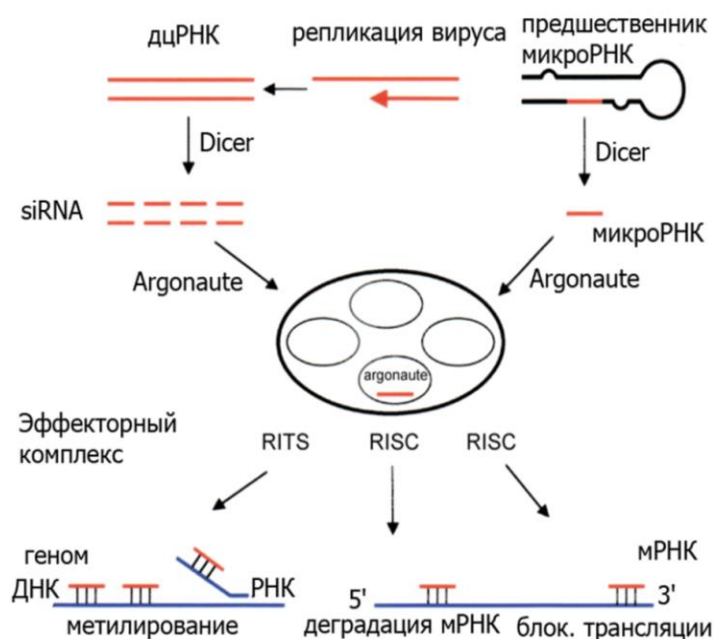
фукозу с образованием связи неспецифичной для животных клеток (альфа 1,3), компания Icon Genetics разработала трансгенную линию ΔXF *N. Benthamiana*, у растений выключены гены, кодирующие ксилозил- и фукозилтрансферазы [273-276]. Данные растительные гликаны могут повлиять на фармакинетику и иммуногенность антител в клетках животного происхождения. Полученные моноклональные антитела с помощью данной трансгенной линии табака являются более гомогенными гликоформами, нежели гликоформы антител, полученных в животных клетках [277]. С помощью транзientной экспрессии в растениях были получены h-6D8, h-13C6 и h-13F6 антитела против вируса Эбола для протекторной стратегии распространения вирусного заболевания [274, p.]. Данные антитела прошли соответствующие процессы очистки при использовании белка А и хроматографии на гидроксиапатите [277, p. 352]. Уровень чистоты антител соответствует международным требованиям для проведения инъекций людям. Результаты исследования показали, что вышеуказанные три антитела против вируса Эбола, полученные в растениях ΔXF *N. Benthamiana*, намного эффективнее по сравнению с антителами, полученными в клетках животного происхождения (NS0). Различие антител состояло в продуцировании растениями и клетками животных различных гликоформ. Вакцины против вируса Эболы были получены в растениях путем экспрессии полипротеина, состоящего из вирусного поверхностного гликопротеина «сшитого» с h-6D8 антителом, которое распознает эпитоп гликопротеина. В результате экспрессии образуются иммунные комплексы путем взаимодействия гибридных молекул друг с другом через формирование связи между антителом и эпитопом [278]. Полученные иммунные комплексы очищаются с помощью аффинной хроматографии, чистота составляет 90%. Иммуногенность и эффективность вакцин были продемонстрированы у мышей. При вакцинации мышей четырьмя дозами иммунного комплекса (10 мкг) совместно с протекторами привели к эффективной иммунизации. Рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста является онкогеном и вовлечен в развитие рака груди и является мишенью для моноклональных антител (Трастузумаб) при лечении заболевания [279]. В 20-30 % случаев метастазирующего рака, причиной служит сверхэкспрессия данного рецептора. Трастузумаб является эффективным средством в лечении рака груди и в настоящий момент является стандартным средством лечения заболевания [280-282]. Трастузумаб производится в растениях, как методом стабильной трансформации, так и транзientной экспрессией. С помощью комплексной технологии антитела были получены в концентрации 200-300 мг/г СБ. В настоящий момент, высокий интерес представляют антитела для борьбы с патогенными грибами. В растениях с помощью транзientной экспрессии были получены гибридные антитела (консервативный фрагмент антитела человека и переменный фрагмент антитела мыши) против бета-глюканов [283]. Полученные антитела оказались эффективными против *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* и *Cryptococcus neoformans* при исследовании на животных моделях. С помощью вирусных векторов в растениях получены Hu-E16

антитела против вируса лихорадки западного Нила. Антитела распознают консервативный эпитоп белка оболочки [284]. С помощью комплексной технологии было получено более 5 г Nu-E16 из 16 кг СБ. При иммунизации мышей Nu-E16 антителами в концентрации 10 мкг, 80% мышей были защищены от летальной инфекции. Кроме того, методами транзientной экспрессии в растениях получены антитела против вируса бешенства.

К комплексным белкам также относят антигены, которые экспрессируют в растениях для целей создания вирусоподобных частиц. ВПЧ один из способов создания вакцин, которые благодаря частоповторяющимся одинаковым паттернам вызывают сильный иммунный ответ. Известными ВПЧ полученными в растениях являются ВПЧ на основе поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В [285-286], ВПЧ на основе экспрессии главного капсидного белка L1 и минорного капсидного белка L1 папилломавируса [287], ВПЧ на основе главного капсидного белка (VP1) норфолк вируса [288], ВПЧ на основе капсидных белков VP2/6/7 ротавирусов [289], ВПЧ на основе капсидного белка Gag, вируса иммунодефицита человека [290].

1.6.5 Вектора для индуцированного умалчивания генов растений

РНК интерференция или РНК- умалчивание является уникальным механизмом растений в борьбе с вирусной инфекцией. Молекулярный механизм РНК - интерференции изображен на рисунке 14. Эндогенными механизмами защиты от вирусной инфекции также являются: предотвращение проникновения вирусов в меристему [291] и синергизм между вирусами при смешанной инфекции [292]. В зависимости от динамики взаимодействия хозяин - вирус, РНК- умалчивание может распространяться либо локально, в зараженной части листа [293], либо по всему листу [292, р. 379], а также системно по всему растению. РНК – интерференция играет важную роль не только в борьбе с вирусной инфекцией, но и участвует в развитии растений, в регуляции экспрессии генов. РНК- интерференция также является защитным механизмом при заболеваниях, вызванных патогенами невирусной природы [294]. Процессы РНК-интерференции были отмечены в нематодах [295] и грибах [296]. Исходя из столь широкого распространения процесса РНК - умалчивания, предполагается что РНК - интерференция является древним молекулярным механизмом регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне [297]. В свою очередь, вирусы растений кодируют супрессоры РНК-умалчивания, происходит постоянная ко-эволюция участников РНК - интерференции и супрессоров. В ряде работ показано, что динамика РНК - интерференции зависит от природы вируса и растения [298].



миРНК формируются с помощью DICER белков при расщеплении репликативной формы и в дальнейшем включаются в RISC комплекс. Включение миРНК в комплекс осуществляется с помощью белков Argonaute. В дальнейшем активированный RISC комплекс участвует в расщеплении мРНК путем комплементарного взаимодействия мРНК с миРНК. Помимо расщепления мРНК, может происходить блокирование трансляции. Предшественник микроРНК- шпильчатые структуры, расщепляются DICER белками с образованием микроРНК. микроРНК активируют RISC комплекс и участвуют в выключении генов.

Рисунок 14 - Схематическое изображение молекулярного механизма РНК- интерференции [293]

Как было описано в главе «Научное и практическое применение вирусов растений», вирусы растений широко используются в разработке VIGS векторов для индуцированного умалчивания генов в растениях, таблица 2. В геном вируса вносится ген растения, который должен быть выключен в растении.

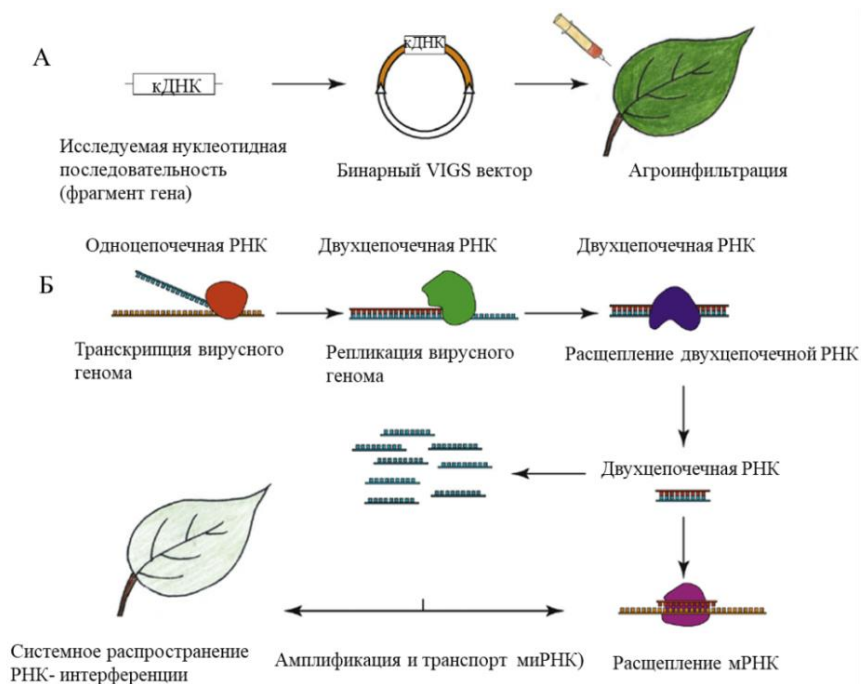
Таблица 2 - Список вирусов, на основе геномов которых были разработаны VIGS вектора

Название	Геном	Природный хозяин	Исследуемое растение
Вирус мозаики африканской кассавы	Одноцепочечный ДНК геном, расположенный на двух молекулах	<i>Manihot esculenta</i>	<i>N. benthamiana</i> , <i>M. esculenta</i>
Латентный сферический вирус яблони	Одноцепочечный +РНК геном, расположенный на двух молекулах	Яблоня	<i>N. tabacum</i> , <i>N. occidentalis</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>N. glutinosa</i> , <i>Solanum lycopersicon</i> , <i>A. thaliana</i> .

Продолжение таблицы 2			
Название	Геном	Природный хозяин	Исследуемое растение
Вирус штриховатой мозаики ячменя	Одноцепочечный +РНК геном, расположенный на трех молекулах	Ячмень, пшеница, кукуруза, шпинат	<i>Hordeum vulgare</i>
Вирус крапчатости бобовых стручков	Одноцепочечный +РНК геном, расположенный на двух молекулах	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Glycine max</i>	<i>G. max</i>
Вирус мозаики костра	Одноцепочечный +РНК геном, расположенный на трех молекулах	Ячмень	<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Zea mays</i>
Вирус курчавости листьев капусты	Одноцепочечный ДНК геном, расположенный на двух молекулах	Капуста, брокколи	<i>A. thaliana</i>
Вирус мозаики огурца	Одноцепочечный +РНК геном, расположенный на трех молекулах	<i>S. lycopersicon</i> , <i>Spinacia oleracea</i>	<i>G. max</i>
Вирус шарки сливы	Одноцепочечный +РНК геном, расположенный на одной молекуле	<i>Prunus</i>	<i>N. benthamiana</i>
Вирус картофеля Х	Одноцепочечный +РНК геном, расположенный на одной молекуле	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Brassica campestris</i> ssp. <i>rapa</i>	<i>N. benthamiana</i> , <i>A. thaliana</i>
Вирус картофеля А	Одноцепочечный +РНК геном, расположенный на одной молекуле	<i>Solanaceae</i>	<i>N. benthamiana</i>
Вирус табачной мозаики	Одноцепочечный +РНК геном, расположенный на одной молекуле	<i>N. tabacum</i>	<i>N. benthamiana</i> , <i>N. tabacum</i>
Вирус погремковости табака	Одноцепочечный +РНК геном, расположенный на двух молекулах	Широкий круг хозяев	<i>N. benthamiana</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>S. lycopersicon</i>

Молекулярный механизм индуцированного умалчивания генов изображен на рисунке 15. Данные векторы являются актуальным инструментом функциональной геномики растений. Тестирование разработанных VIGS векторов проводится путем внесения эндогенных репортерных генов таких, как фитоин дезацетилаза и магний-хелатазы, выключение которых приводит к

изменениям в пигментации листьев. При использовании VIGS векторов на основе генома ВХК, был показан сильный и продолжительный ответ РНК-интерференции в *N. benthamiana* и в картофеле [299]. Природа выключаемого гена в значительной степени влияет на тип ответного умалчивания. При внесении гетерологичного гена (трансгена) в растение с помощью VIGS векторов, запускается локальное умалчивание с последующим системным распространением ответного умалчивания. Системное распространение ответного умалчивания осуществляется с помощью РНК-зависимой РНК полимеразы- 6.



А) Внесение кДНК фрагмента исследуемого гена в вирусный геном, который содержится в Т-ДНК бинарного вектора. Сконструированным вектором проводится трансформация агробактерий с последующей агроинфильтрацией растений. Б) После интеграции Т-ДНК в геном растений, происходит транскрипция вирусного генома с помощью РНК-полимераз растений (красный цвет). Репликация вирусного генома с помощью РНК-зависимых РНК полимераз (зеленый цвет) приводит к формированию двухцепочечных РНК (репликативная форма). DICER- белки (синий цвет) разрезают двухцепочечную РНК на миРНК. миРНК включаются в RISC комплекс, который направляет мРНК для комплементарного взаимодействия с миРНК с целью расщепления мРНК

Рисунок 15 - Схематичное изображение индуцированного умалчивания генов [300]

При внесении эндогена, гена, кодируемого геномом растения, наблюдается только локальный ответ, в клетках, поддерживающих репликацию рекомбинантного вируса [301]. Кроме того, показано, что размер вносимого гена также влияет на ответное умалчивание, для вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) инсерция размером 100 п.о является актуальной при этом

наблюдается продолжительное ответное умалчивание, внесение нуклеотидных последовательностей большего размера приводит к их быстрому удалению из вектора [302]. Для индуцированного умалчивания генов, актуальный размер инсерции в VIGS вектор составляет 100 - 500 п.о, в некоторых случаях инсерция может содержать только 21 п.о [303-304]. Повышенный уровень ответного умалчивания может быть достигнут путем внесения в вектор прямой и обратной последовательностей, что приводит к формированию петель при транскрипции [305-307] и к увеличению количества двухцепочечных форм РНК [308].

VIGS вектора активно используются для изучения абиотического и биотического стресса у растений. Разработанный VIGS вектор на основе генома вируса погрешковости табака позволил выключить ген *lea4*, кодирующий белок позднего эмбриогенеза (LEA), что привело к повышенной чувствительности растений томата к засухе. Растения быстро увядали и медленнее восстанавливались при последующей гидратации. Выключение у перца чили гена, кодирующего внеклеточную пероксидазу 2, привело к повышенной чувствительности растений к осмотическому стрессу, индуцированному маннитолом. На листьях растений появлялись белые пятна, а также было обнаружено интенсивное разрушение хлорофилла [309]. Выключение ABI3/VP1 фактора транскрипции в перце чили с помощью ВПТ-VIGS вектора аналогично приводит к повышенной чувствительности к осмотическому стрессу, индуцированному маннитолом [310]. Кроме того, проведены исследования по индуцированному выключению генов, ассоциированных с засухоустойчивостью, у однодольных. Разработанный VIGS вектор на основе генома ВШМЯ был использован для выключения генов *Era1* и *Sal1* по-отдельности у пшеницы, выключение данных генов привело к повышению засухоустойчивости растений [311]. Кроме того, были проведены исследования по выключению у культурных растений генов, ассоциированных с устойчивостью к солям [312], окислительному стрессу [313]. Индуцированное умалчивание генов было использовано для изучения метаболизма растений, фотосинтеза, процессов созревания плодов, минерального питания и так далее [314]. В настоящий момент, VIGS векторы были использованы для изучения функциональной геномики у 50 видов растений [315]. Таким образом, VIGS векторы могут быть успешно использованы как инструмент прямой и обратной генетики.

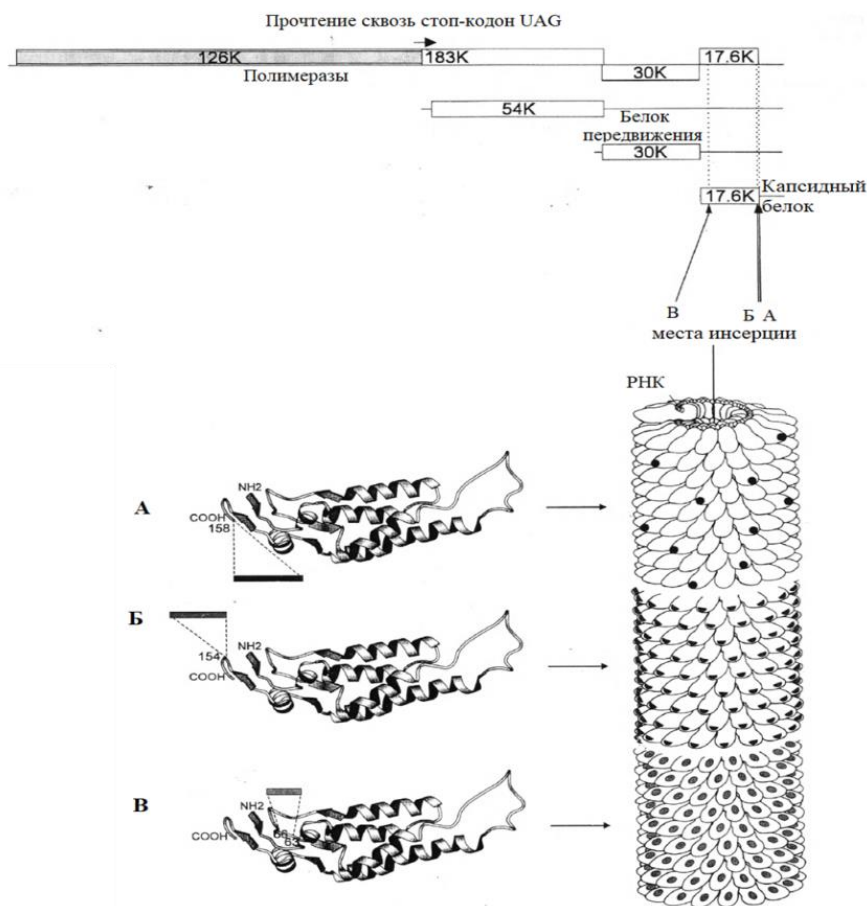
1.6.6 Вирусные вектора для представления эпитопов антигенов, производство вакцин

Вакцинация является самым успешным методом контроля инфекционных заболеваний, которая поспособствовала искоренению оспы. Путем вакцинации успешно контролируются такие заболевания, как краснуха, дифтерия, корь, паротит, а также коклюш [316-317]. Первые вакцины, доминирующие на рынке, состояли из аттенуированных или живых патогенов. Со временем данные вакцины вытесняются субъединичными, состоящих из антигенов, способных

вызывать соответствующий иммунный ответ к тому или иному патогену. В настоящий момент, в Республике Казахстан не получают субъединичные вакцины, известными отечественными вакцинами являются Kazfluvac и Refluvac, которые представляют собой полновирсионные адсорбированные инактивированные вакцины против вируса гриппа (H5N1). Данные вакцины разработаны в НИИ проблем биологической безопасности. Кроме того, ТОО «Научно-производственное предприятие Антиген» производят аттенуированные и живые вакцины для животных. Преимущество субъединичных вакцин заключается прежде всего в их безопасности и эффективности. Антигены, при этом, могут быть получены в клетках животного или растительного происхождения, а также в бактериальных клетках и в дрожжах. В растениях антигены получают путем стабильной трансформации или с помощью транзientной экспрессии при использовании вирусных векторов. Существует два метода производства вакцин в растениях, первый метод включает экспрессию антигенов патогена для формирования вирусоподобных частиц; второй метод включает экспрессию антигена патогена «сшитого» с капсидным белком вируса и тем самым происходит презентация антигена на поверхности вирусной частицы. Результаты исследования данных вакцин показали их эффективность и пригодность для иммунизации животных, в том числе человека. Экспрессия антигена совместно с капсидным белком приводит к многократной упорядоченной экспозиции антигена, что эффективно стимулирует иммунную систему [318]. ВТМ был одним из первых вирусов, на основе которого был разработан вектор для презентации иммуногенных эпитопов. В 1995 году, малярийный эпитоп был успешно экспрессирован с помощью ВТМ вектора в растениях [319]. 5В19 эпитоп вируса гепатита мышей, экспрессированный с помощью ВТМ вектора в растениях, вызвал сильный мукозальный иммунитет при интраназальном введении мышам. Отмечено, что интраназальная иммунизация защитила мышей от летальных доз вируса гепатита. Механизм презентации эпитопов на поверхности ТМВ изображен на рисунке 16. С помощью вектора на основе генома вируса мозаики тюльпанов, в растениях *Arabidopsis thaliana* и *Brassica juncea* был успешно экспрессирован третий рецептор фактора роста эндотелия сосудов [321]. Векторы на основе генома ВХК были использованы для презентации разнообразных эпитопов и целых антигенов путем их экспрессии совместно с капсидным белком вируса, на его N- или С- конце.

Главный капсидный белок VP6 ротавируса [322], Е2 гликопротеин вируса классической чумы свиней [323], нуклеопротеин вируса гриппа А [324], эпитоп R9 (белок оболочки Е2) вируса гепатита С [325] были успешно экспрессированы в растениях как химерные белки на N-конце капсидного белка ВХК. Экспрессия антигенов на N- конце капсидного белка ВХК не влияет на сборку вирусной частицы, а также на репликацию вируса. Тем не менее, сборка химерной вирусной частицы зависит от природы вносимой последовательности, прежде всего от содержания триптофана и генетической стабильности [326]. Некоторые последовательности генетически нестабильны,

как например Е6 онкопротеин вируса папилломы 16, при его экспрессии на N-конце капсидного белка ВХК в растениях, протеин проявляет высокий уровень мутабельности. Помимо экспрессии антигенов на N-конце капсидного белка ВХК, были проведены попытки презентации антигенов на С-конце капсидного белка. Мутантная форма онкопротеина Е6 (мЕ6), а также белок L2 вируса папилломы-16 были экспрессированы на С-конце. Изменение С-конца капсидного белка вируса влияет на сборку вирусных частицы, а также на его системное передвижение по растению, экспрессия L2 привела к неспособности формирования вирусных частиц [327].



А) 5 % капсидных белков содержат эпитоп. Нуклеотидная последовательность, кодирующая эпитоп, вносилась на С-конец после амбер стоп-кодона Б) 100% капсидных белков содержат эпитоп, внесение нуклеотидной последовательности эпитопа осуществлено путем удаления 2 а.о капсидного белка на С-конце. В) 100 % капсидных белков содержат эпитоп, внесение нуклеотидной последовательности эпитопа было осуществлено на N- конце капсидного белка.

Рисунок 16 – Схематическое изображение представления эпитопов на поверхности вирусной частицы ВТМ [320].

При экспрессии мЕ6 на С-конце, наблюдалось формирование вирусных частиц, но системное передвижение по растению не происходило. Наиболее актуальной стратегией для презентации эпитопов и целых антигенов с

помощью ВХК является экспрессия на N-конце его капсидного белка. Для презентации антигенов широко используют всего несколько вирусов, к которым относят, прежде всего, ВТМ, ХВК, АВК, вирус мозаики тюльпанов. Ограничением по использованию остальных вирусов для презентации антигенов служит малоизученность молекулярных механизмов формирования вирусных частиц.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

Плазмиды и векторы: pCASSgva вектор, геном вируса А винограда «собранный» в pCASS2 плазмиде (приложение А), был использован для разработки вирусных векторов. pCASSgva был конструирован Галиакпаровым Н.Н. в Волкани центр, Институт защиты растений (Израиль) [328]. pCASSgva содержит геном изолята РА-3 вируса А винограда, номер в генетической базе данных NCBI – AF007415.2 (приложение Б). Для клонирования и субклонирования в работе были использованы следующие плазмиды: pGEM3zf+, pCAMBIA2300, pBI121. Плазмида pGEM3zf+ была использована для клонирования гетерологичных генов и сборки промежуточных конструкций, для секвенирования гетерологичных генов и некоторых ОРС вируса ВАВ. Плазмида pCAMBIA2300 была использована для субклонирования модифицированного и немодифицированного генома ВАВ и его экспрессии в растениях. Плазмида pBI121 была использована для клонирования гена, кодирующего капсидный белок ВАВ, с целью получения трансгенных растений табака. Селективным антибиотиком для pGEM3zf+ и pCASSgva является ампицилин (100 мкг/ мл), для pCAMBIA2300 и pBI121 – канамицин (50 мкг/ мл).

Бактериальные клетки: Dh5 α , ЕНА105.

Dh5 α является штаммом *E.coli*, который был использован в работе по отбору рекомбинантных молекул полученных при клонировании и субклонировании в промежуточные векторы, а также для амплификации плазмид. Вышеуказанный штамм был использован в амплификации рекомбинантных векторов для целей секвенирования. ЕНА105 является штаммом *Agrobacterium tumefaciens* и клетки данного штамма были использованы для трансформации бинарными векторами, несущими модифицированный/немодифицированный геном ВАВ. Трансформированные клетки использовались для агроинфильтрации растений. Кроме того, клетки ЕНА105 были использованы для разработки трансгенных растений.

Растения. Для исследования экспрессии гетерологичных генов в растениях с помощью разработанных вирусных векторов были использованы растения *Nicotiana benthamiana*. Кроме того, растения *Nicotiana benthamiana* использовались для разработки трансгенных растений со стабильной инсерцией гена, кодирующего капсидный белок ВАВ, в геном растений.

Химические реагенты. Химические реагенты для проведения молекулярно - генетических работ были произведены компаниями Thermo Fisher Scientific, Sigma -Aldrich и Roche Molecular Biochemicals. Чистота реагентов соответствовала международным стандартам.

Ферменты. В работе использовались ферменты компании Thermo Fisher Scientific.

Полимеразы и обратная транскриптаза: *Taq* - полимераз (Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/ μ L), артикул – EP0405); *Pfu* - полимераз (Pfu

DNA Polymerase (recombinant) (2.5 U/ μ L), артикул – EP0501); Обратная транскриптаза (RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/ μ L), артикул – EP0441). Фосфатаза - Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), артикул – 783901000UN. Т4 ДНК лигаза (T4 DNA Ligase (5 U/ μ L), артикул – EL0012). Буферы и базовые растворы для вышеуказанных ферментов отражены в таблице 3.

Таблица 3 - Буферы и базовые растворы для *Taq* и *Pfu* - полимераз, обратной транскриптазы, фосфатазы и Т4 ДНК лигазы

Название фермента	Буфер	Базовый раствор
<i>Taq</i> - полимераз	10X <i>Taq</i> буфер-100 мМ Трис-НCl (pH 8.8 при 25°C), 500 мМ KCl, 0.8% Nonidet P40.	1X <i>Taq</i> буфер, 2.5 мМ MgCl ₂ , 0.2 мМ дНТФ, 2 ед. <i>Taq</i> - полимеразы
<i>Pfu</i> - полимераз	10X <i>Pfu</i> буфер – 200мМ Трис-НCl (pH 8.8 при 25°C), 100мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100мМ KCl, 1% Triton X-100, 1мг/мл BSA, 20мМ MgSO ₄ .	1X <i>Pfu</i> буфер, 0.2 мМ дНТФ, 2.5 ед. <i>Pfu</i> - полимеразы
Обратная транскриптаза	5X RT буфер – 250 мМ Трис-НCl (pH 8.3 при 25 °C), 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl ₂ , 50 мМ DTT.	1X RT буфер, 1 мМ дНТФ, 200 ед. обратной транскриптазы
SAP - фосфатаза	10X SAP буфер – 200 мМ Трис-НCl, pH 8.0, 100 мМ MgCl ₂	1X SAP буфер, 1 ед. фосфатазы
Т4 ДНК лигаза	Т4 буфер – 400 мМ Трис-НCl, 100 мМ MgCl ₂ , 100 мМ DTT, 5 мМ АТФ (pH 7.8 при 25°C).	1X Т4 буфер, 5% PEG ₄₀₀₀ , 5 ед. Т4 ДНК лигазы

Для конструирования векторов и анализа клонирования в работе были использованы эндонуклеазы, список эндонуклеаз отражен в таблице 4.

Таблица 4 – Эндонуклеазы для конструирования векторов

Название	Сайт распознавания	Артикул	Буфер для эндонуклеазы
<i>Cfr9I (XmaI)</i>	5' C ↓ C C G G G 3' 3' G G G C C ↑ C 5'	ER0171	Cfr9I буфер – 10 мМ Трис (pH 7.2), 5 мМ MgCl ₂ , 200 мМ глутамат натрия, 0.1 мг/мл BSA.
<i>XbaI</i>	5' T ↓ C T A G A 3' 3' A G A T C ↑ T 5'	ER0681	Tango буфер – 33 мМ Трис (pH 7.9), 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия, 0.1 мг/мл BSA.
<i>XhoI</i>	5' C ↓ T C G A G 3' 3' G A G C T ↑ C 5'	ER0691	R буфер–10 мМ Трис (pH 8.5), 10 мМ MgCl ₂ , 100 мМ KCl, 0.1 мг/мл BSA. Tango буфер

Продолжение таблицы 4			
Название	Сайт распознавания	Артикул	Буфер для эндонуклеазы
<i>NdeI</i>	5' C A ↓ T A T G 3' 3' G T A T ↑ A C 5'	ER0581	О буфер – 50 mM Трис-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0.1 мг/мл BSA.
<i>BglII</i>	5' A ↓ G A T C T 3' 3' T C T A G ↑ A 5'	ER0082	О буфер
<i>PstI</i>	5' C T G C A ↓ G 3' 3' G ↑ A C G T C 5'	ER0611	О буфер
<i>DpnI</i>	5' G A ^{m6} ↓ T C 3' 3' C T ↑ A ^{m6} G 5'	ER1701	Tango буфер
<i>Eam1105I</i>	5' G A C N N N ↓ N N G T C 3' 3' C T G N N ↑ N N N C A G 5'	ER0241	Eam1105I буфер – 10 mM Трис-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0.1 мг/мл BSA.
<i>BamHI</i>	5' G ↓ G A T C C 3' 3' C C T A G ↑ G 5'	ER0051	BamHI буфер – 10 mM Трис-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl, 0.02% Triton X-100, 0.1 мг/мл BSA.
<i>SalI</i>	5' G ↓ T C G A C 3' 3' C A G C T ↑ G 5'	ER0641	О буфер
<i>Ecl136II</i>	5' G A G ↓ C T C 3' 3' C T C ↑ G A G 5'	ER0251	Ecl136II буфер – 10 mM Трис (pH 6.5), 10 mM MgCl ₂ , 0.1 мг/мл BSA.
<i>AatII</i>	5' G A C G T ↓ C 3' 3' C ↑ T G C A G 5'	ER0991	Tango буфер
<i>SacI</i>	5' G A G C T ↓ C 3' 3' C ↑ T C G A G 5'	ER1135	Sac буфер – 10 mM Трис (pH 6.5), 10 mM MgCl ₂ , 0.1 мг/мл BSA.
<i>PvuII</i>	5' C A G ↓ C T G 3' 3' G T C ↑ G A C 5'	ER0635	G буфер - 10 mM Трис-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 0.1 мг/мл BSA.

Реагенты для РНК - гибридизации. Получение специфичной РНК – пробы было осуществлено с помощью реагентов компании Thermo scientific. Для проведения Нозерн - блот анализа использовались следующие реагенты: химические вещества компании Sigma – Aldrich; Fab фрагмент IgG, конъюгированный с алкальной фосфатазой и связывающийся с дигоксигенином (артикул – 11093274910), компания Roche Molecular Biochemicals; CSPD – субстрат для хемилюминесцентной детекции специфичной гибридизации, компания Roche Molecular Biochemicals.

Реагенты для проведения иммуноблотинга. Первичные антитела к капсидному белку вируса А винограда (артикул – 122219) и к капсидному белку вируса хлоротической пятнистости листьев яблони (артикул – 151019) были произведены компанией Bioreba (Швейцария) и получены в кроликах. Первичные антитела к зеленому флуоресцентному белку (артикул – PA1-980A) были произведены компанией Invitrogen. Вторичные конъюгированные с алкальной фосфатазой антитела к IgG кроликов (артикул – A3687-1ML) были произведены компанией Sigma. Вторичные антитела использовались в

разведении 1:30 000. Буферы для проведения иммуноблотинга готовились из химических реагентов компании Sigma - Aldrich.

Реагенты для определения нуклеотидных последовательностей. Секвенирование гетерологичных генов, последовательностей 2А пептидов, некоторых OPC BAV, векторов было осуществлено на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя.

Питательные среды. В работе использовались питательные среды компании Sigma - Aldrich для культивирования бактерий и растений.

Питательные среды для культивирования бактерий (конструирование векторов): жидкая и твердая Лурия - Бергани (ЛБ) среды. Состав ЛБ среды: 10 г/л - триптон; 10 г/л - NaCl; 5 г/л - дрожжевой экстракт. Жидкая среда готовилась путем добавления 2,5 г ЛБ среды (Артикул – L3522-1KG) в 100 мл биодисциплированной воды. Твердая питательная среда была получена путем добавления к жидкой ЛБ среде бактериального агара в размере 1,5 г на 100 мл среды. Среду стерилизовали методом автоклавирования при 1.05 kg/cm² (15 psi), 121°C в течение 20 мин.

Среда для агроинфильтрации растений: жидкая Мурасиге - Скуга (МС) среда, содержащая 3% сахарозы. Жидкая среда готовилась путем добавления 4,43 г основной МС среды (Артикул – M9274-1L) и 30 г сахарозы в 1 л биодисциплированной воды. Стерилизацию проводили путем автоклавирования при 1.05 kg/cm² (15 psi), 121°C в течение 30 мин.

Питательные среды для разработки трансгенных растений: MSgr, MSgr среды.

MSgr среда – приготовление среды осуществлялось в 1 литре. 4, 43 г. среды МС, 3 г сахарозы, 7 г глюкозы, рН среды доводился до 5.8. Для твердой MSgr среды дополнительно добавлялся агар в размере 2,7 г на литр. Стерилизация среды осуществлялась таким же методом, как и для жидкой МС среды.

MSgr среда – для приготовления 1 литра среды использовалось: 4, 43 г среды МС, 30 г сахарозы, 1 мг 6-BAР, рН среды доводился до 5.8. Для твердой MSgr среды дополнительно добавлялся агар в размере 2,7 г на литр. Стерилизация среды осуществлялась таким же методом, как и для жидкой МС среды.

2.2 Методы

В работе использовались классические методы генетической инженерии. Преобладающей частью работы являлось клонирование и субклонирование нуклеотидных последовательностей. Дизайн праймеров для конструирования векторов, а также для амплификации гетерологичных генов и последовательностей 2А пептидов осуществлялся с помощью модуля Primer – BLAST, NCBI. Доставка вирусных векторов в растения осуществлялась с помощью агробактериальной инфильтрации [329]. Анализ экспрессии

гетерологичных белков в растениях проводился с помощью РНК - гибридизации [330] и иммуноблотинга [331]. Разработка трансгенных растений была осуществлена с помощью агробактериальной доставки гена капсидного белка ВАВ в геном растения *Nicotiana benthamiana* [332]. Исследование генетического родства РА-3 изолята ВАВ относительно известных изолятов генетической базы данных NCBI было осуществлено с помощью филогенетического анализа [333].

1) Приготовление реакционных смесей и физические условия проведения расщепления ДНК эндонуклеазами, «лигирования» ДНК, обратной транскрипции и амплификации ДНК осуществлялось в соответствии с протоколами, прилагаемыми к ферментам.

Для всех процессов клонирования и субклонирования, качество ДНК анализировали в 1% агарозном геле в ТАЕ буфере. Количество ДНК анализировалось при использовании спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

2) Гель - электрофорез ДНК в трис-ацетатном буфере (ТАЕ).

Для проведения агарозного гель - электрофореза в ТАЕ буфере приготавливался 1X трис-ацетатный буфер (40 mM Трис, 1 mM ЭДТА, 17,4 M уксусная кислота использовалась для доведения pH раствора до 7,6), который использовался для приготовления 1% агарозного геля, а также являлся электродным буфером. 1% агарозный гель готовился путем добавления 1 г агарозы (артикул – R0492) в 100 мл 1X ТАЕ буфера с последующим расплавлением агарозы.

Перед заливкой геля в столик, добавлялся бромистый этидиум (артикул – E1510) в концентрации 10 мкг/мл. Электрофорез проводили в горизонтальной камере Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad), источник питания – PowerPac Basic (Bio-Rad). Условия проведения гель - электрофореза: 5-6 В на см² геля. Анализ гель - электрофореза проводился с помощью документирующей системы – Universal Hood II Gel Doc System (Bio-Rad).

3) Выделение ДНК из агарозного геля. В работе, выделение ДНК из агарозного геля проводилось с помощью набора реагентов GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя.

Необходимый фрагмент ДНК вырезался из агарозного геля скальпелем при использовании трансиллюминатора (UV Transilluminator 2000, Bio-Rad). Вырезанный участок геля переносился в 1,5 пробирки Eppendorf. К гелю добавлялся буфер для связывания (Binding buffer) в соотношении 100 мкл буфера на 100 мг геля. Далее проводили инкубирование в течение 10 мин при 55⁰С с периодическим встряхиванием пробирки. Инкубирование проводилось до полного растворения геля. Расплавленный гель в буфере переносили на колонки, содержащие силику. Проводили центрифугирование в течение 1 мин при 10 000 оборотах. Далее проводили промывание колонки путем добавления 700 мкл раствора Washing buffer. Центрифугировали в течение 2 мин при 10 000 оборотах. После промывания, на колонки наносили 50 мкл буфер для

элюирования ДНК (Elution buffer) и центрифугировали в течение 2 мин при 10 000 оборотах. Качество элюированной ДНК анализировали в 1% агарозном геле в ТАЕ буфере. Количество ДНК анализировалось при использовании спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

4) Приготовление химически компетентных клеток Dh5 α .

50 мкл компетентных клеток из стока инокулировали в 3 мл жидкой ЛБ среды без антибиотиков. Инкубирование проводили при 37°C в термошейкере с перемешиванием (200 оборотов/мин) в течение 16 часов. Далее, 50 мкл ночной культуры переносили в 100 мл свежей ЛБ среды. Клетки растили до получения OD₆₀₀ – 0,4 - 0,6. Далее, клетки осаждали центрифугированием при 4°C, 4 тыс. оборотов в течение 10 мин. Центрифуга для осаждения с охлаждением – Eppendorf 5804. Осадок разводили в 20 мл раствора RF1 (100мМ RbCl, 50мМ MnCl₂*4H₂O, 30мМ ацетат калия, 10мМ CaCl₂*2H₂O, 15% глицерин) и инкубировали во льду в течение 10 мин. Далее проводили осаждение при 4°C, 4 тыс. оборотов в течение 10 мин. Осадок разводили в 4 мл раствора RF2 (20мМ MOPS, 75мМ CaCl₂, 10мМ RbCl, 15% глицерин) и инкубировали 15 мин во льду. После инкубирования, компетентные клетки аликвотили по 100 мкл в 1,5 мл пробирки Eppendorf и хранили при температуре -80°C.

Растворы RF1 (pH-5,8) и RF2 (pH-6,5) стерилизовались путем фильтрации через бактериальные фильтры (Millex-HV Syringe Filter Unit, 0.45 мкм, Sigma - Aldrich).

5) Трансформация компетентных клеток Dh5 α . Трансформация проводилась с помощью метода теплового шока [334]. 100 мкл компетентных клеток инкубировали во льду в течение 15 минут, далее к клеткам добавлялась ДНК с последующим инкубированием во льду в течение 30 минут. После инкубации во льду, клетки переносились в термоблок ThermoBlock TDB-120 (Biosan) и выдерживались 1 мин при 42°C. После нагревания клетки переносились в лед и выдерживались 5 минут. Далее, к клеткам добавлялось 250 мкл жидкой ЛБ среды. Клетки растили в течение 1 часа при 37°C с перемешиванием (200 об/мин). ЛБ среда не содержала селективных антибиотиков. Далее, клетки осаждались в центрифуге (Eppendorf 5427R) в течение 5 мин при 4000 об. Осадок клеток разводили в 50 мкл свежей ЛБ среды и наносили на твердую ЛБ среду, содержащую селективные антибиотики.

6) Приготовление химически компетентных клеток ЕНА105.

100 мкл компетентных клеток из стока инокулировали в 5 мл жидкой ЛБ среды. Клетки культивировали в течение 16 часов при 28°C. Далее, 500 мкл клеток переносили в 50 мл свежей жидкой ЛБ среды и растили до OD₆₀₀ – 0,6. Клетки осаждали в центрифуге (Eppendorf 5804) с охлаждением в течение 10 мин при 4000 об., 4°C. Осадок разводили в 5 мл 20мМ RbCl и инкубировали во льду 5 минут. После инкубирования, проводили осаждение клеток в течение 10 мин при 4000 об., 4°C. Осадок разводили в 1 мл 20мМ RbCl и инкубировали во льду в течение 20 минут. Далее, клетки аликвотили по 100 мкл в 1,5 мл пробирки Eppendorf и хранили при температуре -80°C.

7) Трансформация компетентных клеток ЕНА105. Трансформацию клеток проводили методом замораживания/оттаивания [335].

100 мкл компетентных клеток инкубировали во льду в течение 10 мин, далее к клеткам добавляли ДНК и проводили инкубирование во льду в течение 5 минут. Клетки замораживали в 96% спирте, заранее охлажденном при температуре -80°C . Далее клетки выдерживали в течение 7 минут при комнатной температуре. К клеткам добавляли 1 мл жидкой ЛБ среды без селективных антибиотиков. Клетки растили в течение 3 часов при 28°C . Далее проводили осаждение клеток в центрифуге (Eppendorf 5427R) при 4 тыс. оборотов в течение 5 мин. Осадок разводили в 50 мкл свежей жидкой ЛБ среды, и разведенный осадок наносили на поверхность твердой ЛБ среды, содержащей селективный антибиотик.

8) Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Выделение плазмидной ДНК проводили при использовании набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Центрифугирование осуществлялось при использовании центрифуги Eppendorf 5427R.

Бактериальные клетки, содержащие плазмидную ДНК, осаждали при 5 000 оборотах в течение 5 мин. К осадку клеток добавляли 250 мкл буфера для ресуспендирования (Resuspension buffer). Клетки ресуспендировали с помощью пипетирования автоматической пипеткой. К гомогенной суспензии клеток добавляли 250 мкл лизирующего раствора (Lysis solution), проводили перемешивание 5-6 раз (переворачивание пробирки вниз-вверх). К полученной смеси добавляли 350 мкл нейтрализующего раствора (Neutralization Solution), пробирку аккуратно переворачивали 4-5 раз. Далее проводили центрифугирование в течение 15 мин при 10 000 оборотах. Надосадочную жидкость (супернатант) переносили на колонки, содержащие силику. Центрифугировали в течение 1 мин при 10 000 оборотах. Далее колонку дважды промывали 500 мкл промывочного раствора (Wash Solution). После каждого промывания проводили центрифугирование в течение 1 мин при 10 000 оборотах. После второго промывания на колонки наносилось 100 мкл буфера для элюирования ДНК (Elution buffer) с последующим инкубированием в течение 2 мин при комнатной температуре. Далее проводили центрифугирование в течение 2 мин при 10 000 оборотах. Качество элюированной ДНК анализировали в 1% агарозном геле в ТАЕ буфере. Количество ДНК анализировалось при использовании спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

9) Определение нуклеотидных последовательностей ДНК (секвенирование). Секвенирование ДНК проводилось согласно протоколу для набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и осуществлялось на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Программа для секвенирования использовалась в соответствии с протоколом прилагаемым к генетическому анализатору. Для проведения секвенирования, изначально, проводилась амплификация целевого участка ДНК со специфичным

праймером. Реакционная смесь для амплификации содержала: 300 нг целевой ДНК, 3.2 пМ праймера, 0.75X буфер для секвенирования, 0.25X терминатор, смесь доводилась до 10 мкл деионизированной водой. Программа амплификации включала: 1. Общая денатурация, 2 мин – 96°C; 2. Циклирование. 25 циклов: 1а) денатурация, 10 сек – 96°C; 2б) отжиг праймеров, 10 сек – 50°C; 3в) элонгация, 3 мин – 60°C.

После амплификации сиквенсовую смесь очищали от остатков несвязанных нуклеотидов путем осаждения 75% спиртом. К 10 мкл сиквенсовой смеси добавляли 50 мкл 75% спирта, проводили инкубирование в течение 15 мин при комнатной температуре в темном месте. Далее проводили осаждение в центрифуге (Eppendorf 5427R) в течение 15 мин при 14000 оборотах. После осаждения осадок высушивали при комнатной температуре на химическом столе. Осадок разводили в 10 мкл формамида (артикул – 11814320001, Roche). Далее проводили денатурацию ДНК в течение 4 мин при температуре 96°C. После денатурации проводили охлаждение во льду в течение 3 мин. Очищенная амплифицированная ДНК в формамиде загружалась в стрипы для секвенирования и переносилась в генетический анализатор.

Анализ секвенированных последовательностей осуществлялся с помощью программ Sequencing analysis 5.2 и DNAMAN.

10) Вестерн - блот анализ.

Для проведения Вестерн - блот анализа, белки выделялись из целевого растительного материала. Метод выделения был основан на использовании мочевины [336]. Выделение белков осуществлялось с помощью ESB - буфера (9М мочевины, 4,5% додецилсульфат натрия, 75 мМ Трис-HCl (pH - 6,8), 7,5% 2-меркаптоэтанол добавлялся перед использованием). Соотношение растительного материала и буфера составляло 1:5. Растительный материал гомогенизировался в фарфоровых ступках. Далее гомогенат переносился в 1,5 мл пробирки и нагревался в течение 10 мин при 100°C. После нагревания проводили центрифугирование в течение 10 мин при 10 тыс. оборотов. Супернатант переносился в новые пробирки. Перед внесением образцов белка в полиакриламидный гель, к образцам добавлялся LB - буфер (10% глицерол, ~0,01% бромфеноловый синий).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ).

Для электрофореза приготавливался 10% ПААГ. Электрофорез проводился в камере Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-Rad). Сила тока для электрофореза составляла 40мА, напряжение - 150В.

ПААГ состоял из разделяющего и концентрирующего гелей. Приготовление 10% разделяющего геля. Гель готовился в объеме 5 мл, который содержал 0,97 мл деионизированной воды, 2,08 мл акриламида: бис-акриламида (30%), 1,875 мл Трис-HCl (pH - 8,8), 25 мкл додецилсульфата натрия (20%), 50 мкл персульфата аммония (10%), 4 мкл TEMED. Приготовленный раствор незамедлительно заливался в камеру. Сверху геля наслаивалась вода в объеме 1 мл, для выравнивания уровня и удаления пузырей воздуха. После

полимеризации геля, вода удалялась фильтровальной бумагой, и готовился концентрирующий гель.

Приготовление концентрирующего геля. Гель готовился в объеме 2 мл, который содержал 1,36 мл деионизированной воды, 0,33 акриламида: бис-акриламида (30%), 0,25 мл Трис-НCl (pH -6,8), 10 мкл додецилсульфата натрия (20%), 20 мкл персульфата аммония (10%), 2 мкл TEMED. Приготовленный раствор заливался сверху разделяющего геля в камеру. В жидкий концентрирующий гель вставлялась гребенка для формирования лунок.

Образцы белков, объемом 30 мкл, вносились в каждую лунку. Также в лунку вносился маркер - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo fisher scientific). Образцы вносились в два разных геля, один гель использовался для переноса белков на мембрану, второй гель окрашивался Coomassie Blue R250. Электрофорез проводился в трис - глициновом буфере (25 mM Трис, 250 mM глицин, 10% додецилсульфат натрия), pH буфера – 8,3. Окрашивание проводили с целью анализа качества электрофореза и количественного анализа белков в разных образцах. Раствор для окрашивания: 0,25% Coomassie Blue R250, 45% этанол, 10% уксусная кислота. Гель помещался в 300 мл раствора для окрашивания и выдерживался в течение 1 часа с периодическим перемешиванием при комнатной температуре. Далее раствор для окрашивания удалялся, и добавлялось 200 мл раствора для промывания. Раствор для промывания: 5% уксусная кислота, 20% пропанола. Гель выдерживался в течение 2 часов в растворе для промывания. Далее гель промывался деионизированной водой и анализировался с помощью программы Image Studio Lite 5.2 program (LI-COR).

Перенос белков на PVDF мембрану (Sigma-Aldrich). Для переноса белков на мембрану готовился раствор для переноса (47,9 mM Трис, 38,6 mM глицин, 10% додецилсульфат натрия, 40% пропанол). Три листка ватмана, имеющих одинаковую площадь с мембраной, помещались в раствор для переноса. Излишки раствора удалялись, и листки переносились на нижнюю пластину (катодный электрод) камеры для «полусухого» переноса белков (Owl™ NEP Series, Thermo Fisher Scientific). На ватманн помещался гель, смоченный в буфере для переноса. На гель накладывалась мембрана, которая предварительно смачивалась в 99,5% пропаноле, и только потом в буфере для трансфера. На мембрану накладывали 3 листка ватмана, смоченные в буфере для переноса. Далее на поверхность ватмана помещалась верхняя пластина (анодный электрод), и проводился трансфер. Напряжение составляло 2 мА на см² геля. Перенос проводился в течение 1 часа. Далее, листки ватмана удалялись, а мембрана промывалась TBS буфером (50 mM Трис- HCl (pH – 7,6), 150 mM NaCl) дважды в течение 1 мин. Далее мембрану инкубировали в TBS буфере, который содержал 5% сухого молока (Frima), время инкубации составило 1 час при комнатной температуре на угловом шейкере (MR-12, Biosan). Все процессы инкубирования и промывания мембраны осуществлялись на угловом шейкере. После инкубирования проводили промывание мембраны 3 раза в TBS буфере по 5 мин. После промывания, мембрану инкубировали с

первичными антителами (антитела к уЗФБ/капсидному белку ВХПЛЯ), в TBS буфер с 5% молоком добавлялись антитела в разведении 1:1000. Мембрану с антителами инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее мембрану промывали 3 раза по 5 мин в TBST буфере (50 мМ Трис- HCl (pH – 7,6), 150 мМ NaCl, 0,1% Tween 20). После промывания, мембрану инкубировали со вторичными конъюгированными антителами в TBS буфере с 5% молоком, антитела добавляли в разведении 1:30000. Инкубирование проводили в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания, проводили промывание мембраны, таким же образом, как и после инкубирования с первичными антителами. Далее готовился субстрат для алкальной фосфатазы – SIGMAFAST™ Fast Red TR/Naphthol AS-MX (Sigma-Aldrich). 1 таблетка, содержащая 0,1М Трис, растворялась в 10 мл деионизированной воды, далее к Трис буферу добавлялась таблетка, которая содержит субстрат (4-Chloro-2-methylbenzenediazonium/3-Hydroxy-2-naphthoic acid 2,4-dimethylanilide phosphate), 0,15 мг/мл левамизол. Мембрану покрывали субстратом и инкубировали в течение 30 мин, далее визуально анализировали окрашивание, и при необходимости инкубировали дополнительно 30 мин. Далее, субстрат удаляли и мембрану промывали в деионизированной воде. Анализ экспрессии целевых белков проводили денситометрическим анализом при использовании программы Image Studio Lite 5.2 program (LI-COR).

2.2.1 Филогенетический анализ ВАВ

Филогенетический анализ был проведен для 12 изолятов ВАВ, взятых из генетической базы данных NCBI, таблица 5. Для анализа использовалась аминокислотная последовательность 4-х белков (РНК-зависимая РНК полимераза, капсидный белок, белок передвижения, Р10 - супрессор РНК - интерференции), кодируемых геном. Программа для выравнивания последовательностей – Geany, построение филогенетических древ осуществлялось с помощью программы MEGA7, метод ближайшего соседа.

Таблица 5 - описание изолятов Вируса А винограда

Изолят	Регион	Репликаза	Белок передвижения	Капсидный белок	P10
GTR1-1	South Africa	ABG37965.1	ABG37963.1	ABG37962.1	ABG37961.1
P163-1	South Africa	ABH07008.1	ABH07010.1	ABH07011.1	ABH07012.1
3138-03	Canada	AFV73358.1	AFV73360.1	AFV73361.1	AFV73362.1
GTG11-1	South Africa	ABH06996.2	ABH06995.2	ABH06993.1	ABH06994.1
GTR1-2	South Africa	ABL14358.1	ABH07003.2	ABH07001.1	ABH07002.1
GTR1SD-1	South Africa	ABH06983.2	ABH06982.2	ABH06984.1	ABH06981.1

Продолжение таблицы 5

Изолят	Регион	Репликаза	Белок передвижения	Капсидный белок	P10
BMo32-1	South Africa	ACA52189.1	ABN07005.1	ABN07006.1	ABN07007.1
TRAJ2-BR	Brazil	AOX49240.1	AOX49242.1	AOX49243.1	AOX49244.1
Is 151	Italy	NP_619662.1	NP_619664.1	NP_619665.1	NP_619666.2
KWVMo4-1	South Africa	ABN06992.2	ABN06991.2	ABN06989.1	ABN06990.1
P163-M5	South Africa	ABN06988.2	ABN06987.2	ABN06985.1	ABN06986.1
PA-3	Italy	AAO17778.1	AAB62938.2	AAB62939.2	AAO17780.1

Изоляты TRAJ2-BR (Бразилия, 2016), 3138-03 (Канада, 2012), PA3 (Италия, 2003) ранее не исследовались с целью определения их генетической принадлежности к той или иной группе ВAB. Изоляты из ЮА и Is 151 (Италия) изолят с помощью генетического анализа были распределены в 3 группы, вторая группа была сформирована изолятами высокой патогенности.

2.2.2 Стратегия создания вирусного вектора на основе полного генома вируса А винограда

Для разработки вирусного вектора на основе полного генома ВAB, была использована плазида pCASSgva. Данная плазида несет полный немодифицированный геном вируса А винограда, при этом вирус является инфекционным. Стратегия разработки вектора заключалась во внесении гетерологичного гена между OPC4 и OPC5 генома ВAB [337]. Гетерологичный ген находился в рамке считывания с OPC4 и OPC5 и под контролем субгеномного промотора капсидного белка ВAB. Ввиду того, что предположительный субгеномный промотор OPC5 находится в 5'-концевой части OPC4 и внесение трансгена приводит к его выключению, OPC5 был в рамке с трансгеном и OPC4. Анализ генома ВAB для поиска субгеномного промотора осуществлялся с помощью программы DNARNAREf (приложение В). Стоп - кодоны у капсидного белка ВAB и трансгена были удалены. Трансляция предполагала получение полипептида, состоявшего из 3-х белков, капсидного белка ВAB, гетерологичного белка и белка P10. Для котрансляционного разделения данных белков использовались последовательности T2A и E2A пептидов, которые были внесены между OPC4 и трансгеном и между трансгеном и OPC5 соответственно [338]. T2A и E2A пептиды относятся к классу 2A пептидов, которые кодируются геномами вирусов и участвуют в котрансляционном разделении вирусных полипептидов. T2A последовательность используется Thossea asigna вирусом для разделения своих полипептидов. E2A последовательность была обнаружена у риновируса лошадей. Внесение 2A пептидов позволила с высокой эффективностью

получить разъединенные белки, находящиеся в одной рамке считывания. При этом, не было необходимости вносить несколько промоторов или сайты внутренней посадки рибосомы, которые являются достаточно протяженными последовательностями и могут мешать упаковке генома, а также могут препятствовать эквимольной экспрессии гетерологичных генов. Модифицированный геном ВАВ в дальнейшем был субклонирован в бинарный вектор для агробактериальной доставки в растения. Эффективность вирусного вектора была анализирована путем внесения гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок и гена, кодирующего капсидный белок вируса хлоротической пятнистости листьев яблони, данные гены вносились поотдельности.

2.2.2.1 Дизайн праймеров для сайт - направленного мутагенеза генома ВАВ и синтеза последовательностей 2А пептидов

Дизайн праймеров был осуществлен с помощью модуля Primer – BLAST, NCBI. Информация о праймерах, которые использовались в разработке вирусного вектора, отражена в таблице 6. Праймеры 201266 и 201267 использовались для сайт - направленного мутагенеза генома ВАВ путем удаления стоп-кодона капсидного белка и внесения *Cfr9I* и *XbaI* сайтов рестрикции между ОРС4 и ОРС5. Сайты рестрикции были использованы для клонирования кассет, несущих последовательности 2А пептидов и гетерологичные гены, расположенные между этими последовательностями.

Таблица 6 – Список праймеров для конструирования векторов

Название праймера	Последовательность праймера 5'- 3'	Расположение праймера
201267	gtttagatcttctagaatggatgacccatcgtttctcg	6998 - 7032 п.о. относительно генома ВАВ
201266	caaaagatctcccgggtatctcgacagcctctcac	6988 - 7006 п.о. относительно генома ВАВ
T2A1	gtttcccgggagggcagaggaagtctgctaactgcggtgacgctgagg	5' - последовательность Т2А пептида
T2A2	gtttagatctcatatgtgggccaggattctctcgacgtcaccgcatgtt	3' - последовательность Т2А пептида
E2A1	gtttagatctctcgagcaatgtactaactacgcttgttgaaactcgctggcg	5' - последовательность E2А пептида
E2A2	gttttctagaaggaccggggtactttcaacatcgccagcgagttcaaaaa	3' - последовательность E2А пептида
pE-f	tgcctgggaccccgtagtgtagataac	1328 - 1354 п.о. относительно последовательности pGEM3zf+ плазмиды
pE-r	actatggatgaacgaaatagacagatc	1301 - 1327 п.о. относительно последовательности pGEM3zf+ плазмиды

Продолжение таблицы 6		
Название праймера	Последовательность праймера 5' - 3'	Расположение праймера
lac-r	gtttattgctgataaatctggag	1423 - 1445 п.о. относительно последовательности pGEM3zf+ плазмиды
mE-f	tcgaccgaccttgagtctctagagacctaacgtcag	Последовательность, несущая <i>Eam1105I</i> сайты
mE-r	gacacctgacgttaggtctctagagactcaaggctcgg	Последовательность, несущая <i>Eam1105I</i> сайты
M13 (обратный)	caggaaacagctatgac	104 - 120 п.о. относительно последовательности pGEM3zf+ плазмиды
T7	taatacgactcactataggg	Праймер для T7 - промотора
eGFP-f	gtttcatatgggtgagcaagggcgag	5' - праймер для гена уЗФБ
eGFP-r	gtttctcgagctgtacagctcgtccatg	3' - праймер для гена уЗФБ
200709	actgtgatacaggctatgca	6909 - 6928 п.о. относительно генома ВАВ
200710	ctcatcgtctgaggtttcta	7258 - 7277 п.о. относительно генома ВАВ
201218	accacacttacacacattcat	7074 - 7094 п.о. относительно генома ВАВ
201364	cgaaaccttaagcgcatgt	6069 - 6088 п.о. относительно генома ВАВ
f-mid-GFP	agatccgccacaacatcgag	500 - 519 п.о. относительно гена уЗФБ
f-mid-K2	gcaaatacccggagctgatg	410 - 429 п.о. относительно гена капсидного белка ВХПЛЯ
201268	cttagatctcccggtcagttggcgtggctttcg	6472 - 6491 п.о. относительно генома ВАВ
aCP-f	gaaggcatatggcagcagttctgaacctgca	5' - праймер для гена капсидного белка ВХПЛЯ
aCP-r	acagactcgaggcaagatcagttgaaac	3' - праймер для гена капсидного белка ВХПЛЯ
aCPdet-f	ggtgaagtcgatggaggacc	186 - 205 п.о. относительно гена капсидного белка ВХПЛЯ
aCPdet-r	gtaaagaggtagtgaaaacccct	365 - 389 п.о. относительно гена капсидного белка ВХПЛЯ

Праймеры T2A1 и T2A2 использовались для получения нуклеотидной последовательности T2A пептида. Праймер T2A1 на 5'-конце имеет сайт рестрикции *Cfr9I*. T2A2 праймер на своем 5'-конце содержит два сайта рестрикции, *NdeI* и *BglII*. Праймеры E2A1 и E2A2 использовались для получения нуклеотидной последовательности E2A пептида. E2A1 праймер на

своем 5'-конце несет сайты рестрикции *Bgl*III и *Xho*I, в то время как E2A2 на своем 5'-конце содержит *Xba*I сайт. Получение T2A и E2A последовательностей осуществлялось методом эквимольного ПЦР [338, с.146]. Амплификацию проводили при использовании *Taq* - полимеразы. Реакционная смесь содержала базовый раствор для *Taq* - полимеразы, 5 мМ каждого праймера. Программа амплификации состояла из: 1. Общей денатурации в течение 1 мин – 95⁰С; 2. Циклирования. 15 циклов: 2а – денатурация при 95⁰С – 10 сек., 2б – отжиг праймеров при 67⁰С – 15 сек., элонгация при 72⁰С – 20 сек; 3. Финальной элонгации при 72⁰С – 1 мин. ПЦР - продукт анализировали путем гель - электрофореза в 1% агарозном геле в ТАЕ буфере.

Ввиду того, что эффективность расщепления эндонуклеазами снижается, если сайты рестрикции расположены на концах последовательностей, перед сайтами рестрикции были внесены дополнительно по 4 нуклеотида. Дизайн праймеров был осуществлен таким образом, чтобы максимально уменьшить вероятность образования шпилечных структур. Анализ гомодимеров был осуществлен с помощью интегрированной программы Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies).

2.2.2.2 Удаление первых ОРС и внесение рестрикционных сайтов между ОРС4 и ОРС5 генома ВАВ

Удаление первых ОРС (ОРС1-3) генома ВАВ было осуществлено путем расщепления с помощью эндонуклеазы *Pst*I. Удаление осуществлялось из плазмиды рCASSgva. Один *Pst*I сайт расположен на конце ОРС3, 6174 п.о. – позиция сайта относительно генома ВАВ. Второй сайт расположен перед 35S промотором. Первые ОРС ВАВ совместно с 35S промотором составляют 7200 п.о.. Расщепление проводилось при 37⁰С в течение 4 часов. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 1X О буфер, 400 нг ДНК, 5 ед. *Pst*I эндонуклеазы. Далее, проводился электрофорез в 1% агарозный гель для анализа результатов расщепления. Расщепленная молекула была выделена из агарозного геля набором GeneJET Gel Extraction Kit и использовалась для самолигирования с помощью Т4 ДНК лигазы. Реакционная смесь для лигирования объемом 10 мкл содержала базовый раствор для Т4 ДНК лигазы, 150 нг ДНК. Лигирование проводили в течении 16 часов при температуре 4⁰С. Далее, лигазную смесь инкубировали в течении 15 минут при 75⁰С для инактивации Т4 ДНК лигазы. Для отбора самолигированных молекул проводили трансформацию Dh5 α компетентных клеток методом теплового шока. Трансформированные клетки переносились на твердую ЛБ среду, содержащую ампициллин. На твердой среде клетки инкубировались в течении 14 –16 часов при 37⁰С. Далее, колонии с твердой среды инокулировались в жидкую ЛБ среду. Каждую колонию инокулировали в 3 мл жидкой ЛБ среды с ампициллином. Клетки растили в инкубаторе с перемешиванием (200 об/мин) в течении 15 часов при температуре 37⁰С. Выделение ДНК из бактериальных клеток проводилось набором GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Отобранные клоны самолигированного вектора или V1 вектора были использованы для проведения ПЦР - мутагенеза с

помощью праймеров 201266 и 201267. С помощью данных праймеров был удален стоп - кодон КБ ВАВ, а также внесены сайты рестрикции *Cfr9I* и *XbaI* для клонирования кассеты, содержащей последовательности 2А пептидов и гетерологичного гена между ними. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала базовый раствор для *Pfu* - полимеразы, 0.2 мМ каждого праймера, 40 нг V1 вектора. ПЦР проводили по следующей программе: 1. Общая денатурация в течение 3 минут – 95°C. 2. Циклирование. 15 циклов: 2а – денатурация при 95°C – 20 сек., 2б – отжиг праймеров при 47°C – 20 сек., элонгация при 72°C – 6 мин. 30 циклов: 2а – денатурация при 95°C – 20 сек., 2б – отжиг праймеров при 58°C – 20 сек., элонгация при 72°C – 6 мин. 3. Финальная элонгация при 72°C – 10 мин.

После амплификации, 2 мкл реакционной смеси наносили в 1% агарозный гель для анализа продуктов амплификации методом гель - электрофореза. Оставшуюся реакционную смесь подвергали гидролизу эндонуклеазой *DpnI*. *DpnI* участвует в гидролизе последовательности 5'-GATC-3' при наличии метилированного основания гуанидина [339]. В результате происходит расщепление плазмиды - матрицы. Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала базовый раствор для эндонуклеазы *DpnI*, 23 мкл ПЦР - продукта. Инкубирование проводили при 37°C в течение 1 часа. Инактивацию фермента осуществляли путем нагревания при 80°C в течение 20 минут. Далее, ПЦР - продукт выделяли из геля с помощью GeneJET Gel Extraction Kit и подвергали самолигированию с целью получения вектора V1a. Для лигирования использовалось базовый раствор Т4 ДНК - лигазы, 100 нг очищенного ПЦР - продукта. Реакционная смесь инкубировали при +4°C в течение 14-16 часов. Реакционная смесь использовалась для трансформации компетентных клеток Dh5α. Колонии, выросшие на твердой ЛБ среде, инокулировали в жидкую ЛБ среду с последующим выделением плазмидной ДНК. Отобранные клоны V1a вектора секвенировали с использованием праймера 200710. Данный вектор использовался для внесения кассеты, содержащей последовательности 2А пептидов и гетерологичного гена между ними.

2.2.2.3 Клонирование и секвенирование последовательностей 2А пептидов. Разработка Т - вектора

Т2А и Е2А нуклеотидные последовательности после эквимольной амплификации были клонированы в Т-рGEM3zf+ вектор методом Т/А клонирования. После амплификации с помощью *Taq* - полимеразы, на 3'-концах амплифицированных последовательностей 2А пептидов имелись неспаренные дезоксиаденозины, что позволяло напрямую клонировать ПЦР - продукты в Т-вектор с неспаренными дезокситимидинами на 3'-концах. Т-вектор (Т-рGEM3zf+) с неспаренными дезокситимидинами на 3'-концах был получен путем внесения последовательности, содержащей *Eam1105I* сайты рестрикции, в сайт множественного клонирования плазмиды рGEM3zf+ [340,

341]. Расщепление по *Eam1105I* сайтам приводило к образованию неспаренных дезокситимидинов на 3'-концах.

Удаление *Eam1105I* сайта из гена, кодирующего β - лактамазу в плазмиде pGEM 3zf(+).

Ген, кодирующий β - лактамазу в плазмиде pGEM 3zf(+) содержит рестрикционный сайт *Eam1105I*, который мешает в разработке Т-вектора, рисунок 17. Удаление этого сайта проводилось методом ПЦР - опосредованного мутагенеза с помощью специфичных праймеров рЕ-ф и рЕ-г, которые изменяли последовательность *Eam1105I* сайта без изменения аминокислотной последовательности β -лактамазы. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала базовый раствор для *Pfu* - полимеразы, 40 нг pGEM 3zf(+), 0.2 мМ каждого праймера. Реакционная смесь доводилась деионизированной водой до 25 мкл. Амплификацию проводили по следующей программе: 1. Общая денатурация в течение 3 минут – 95°C. 2. Циклирование. 30 циклов: 2а – денатурация при 95°C – 30 сек., 2б – отжиг праймеров при 56°C – 20 сек., элонгация при 72°C – 6 мин. 3. Финальная элонгация при 72°C – 15 мин. 1 мкл ПЦР - продукта анализировали в 1% агарозном геле методом гель - электрофореза. 23 мкл оставшейся смеси использовали для расщепления матрицы. Объем реакционной смеси составил 30 мкл, в состав входили раствор для эндонуклеазы *DpnI*, 23 мкл ПЦР - продукта. Инкубирование проводили при 37°C в течение 1 часа. Далее проводили гель - электрофорез в ТАЕ буфере в 1 % агарозном геле. Целевой продукт выделялся из геля и использовался для самолигирования.

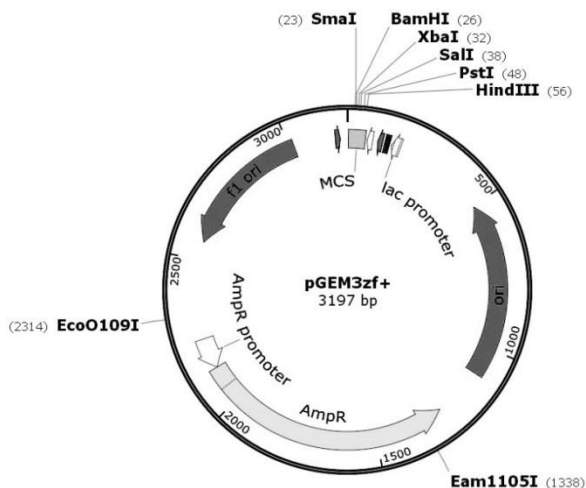


Рисунок 17 – Изображение вектора pGEM 3zf+

Самолигирование проводили в 10 мкл реакционной смеси, которая содержала базовый раствор для Т4 ДНК лигазы, 100 нг очищенного ПЦР - продукта. Лигазной смесью трансформировали *Dh5 α* . Колонии с твердой ЛБ среды инокулировали в 3 мл жидкой ЛБ среды и растили в течение 16 часов. Далее проводили выделение плазмидной ДНК и секвенирование модифицированной области гена β - лактамазы при использовании праймера

лас-г. Полученная плазмида с удаленным *Eam1105I* сайтом в гене β - лактамазы маркирована как m-pGEM 3zf(+).

Внесение рестрикционных сайтов *Eam1105I* в область множественного клонирования плазмиды m-pGEM 3zf(+).

Праймеры mE-f и mE-g, по 2 мМ каждого, вносили в 1X Taq буфер, далее смесь нагревали при 94°C в течение 2 минут, затем медленно охлаждали до 20°C. Праймера комплементарно соединялись друг с другом с образованием на обоих 5'-концах по четыре неспаренных нуклеотида, соответствующих остаткам после расщепления ферментами *BamHI* и *SalI*. Комплементарная часть ДНК содержит два сайта *Eam1105I* и один рестрикционный сайт *XbaI*, между ними. Далее, комплементарно спаренные праймеры использовали для клонирования в m-pGEM3zf(+), расщепленную по сайтам *BamHI* и *SalI*. Расщепление вектора m-pGEM3zf(+) проводили в течение 2 часов при 37°C. Реакционная смесь содержала 1X *BamHI* буфер, 310 нг m-pGEM3zf(+) вектора, 5 ед. *BamHI* и 10 ед. *SalI* эндонуклеаз. Расщепленный вектор анализировали гелем - электрофорезом в 1% агарозном геле. Выделенный из геля вектор использовался в лигировании. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала базовый раствор для T4 ДНК лигазы, 50 нг вектора и 7 мкл комплементарной ДНК. Лигирование проводили в течение 5 часов при комнатной температуре. Лигазной смесью проводили трансформацию клеток *Dh5 α* . Из отобранных клонов выделяли плазмидную ДНК, модифицированную область анализировали секвенированием. Секвенирование проводили при использовании M13 обратного праймера. Полученный вектор после клонирования был маркирован как T-3zf(+).

Для повышения эффективности расщепления эндонуклеазой *Eam1105I*, между сайтами *Eam1105I* был внесен фрагмент ДНК (спейсер) размером в 282 пар нуклеотидов. Внесение спейсера осуществлялось в вектор T-3zf(+) по сайту рестрикции *XbaI*. Для расщепления использовались 1X Tango буфер, 350 нг T-3zf(+) вектора, 2 ед. *XbaI*. Реакционную смесь инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Расщепленный вектор анализировали гелем - электрофорезом в 1% агарозном геле. Расщепленный вектор выделяли из геля и использовали в лигировании со спейсером. Спейсер представляет собой участок экзона гена, кодирующего фактор стволовых клеток (SCF). После проведения обратной транскрипции и последующего ПЦР, транскрипты гена SCF размером 330 и 420 п.о. анализировали методом секвенирования [342]. После определения сайтов рестрикции *XbaI* в 420 п.о. транскрипте, ПЦР - продукт расщеплялся по данным сайтам. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1X Tango буфер, 300 нг очищенного ПЦР - продукта, 5 ед. *XbaI*. Расщепление проводили в течение 2 часов при 37°C. Результаты расщепления анализировали гелем - электрофорезом в 1 % агарозном геле. В результате расщепления получали продукт размером 282 п.о., который выделяли из геля и использовали в лигировании. Лигирование проводили при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала базовый раствор для T4 ДНК лигазы, 50 нг T-3zf(+) вектора, 14 нг спейсера. Лигазной смесью проводили трансформацию *Dh5 α*

клеток. Из отобранных колоний выделяли плазмидную ДНК. Для анализа наличия спейсера в векторе T-3zf(+) было отобрано 5 клонов, анализ проводился путем расщепления по сайтам *XbaI*. Реакционная смесь содержала 1X Tango буфер, 300 нг вектора, 2 ед. *XbaI*. Расщепление проводили в течение 1 часа при 37 С. Результаты расщепления анализировали гель - электрофорезом в 1% агарозном геле. Полученный вектор со спейсером между *Eam1105I* сайтами был маркирован как T-pGEM3zf+.

Клонирование последовательностей 2А пептидов в T-pGEM3zf+.

Было осуществлено клонирование T2A и E2A амплифицированных последовательностей в вектор T-pGEM3zf+, расщепленного по сайтам *Eam1105I*. Реакционная смесь содержала 1X *Eam1105I* буфер, 300 нг T-pGEM3zf+ вектора, 5 ед. *Eam1105I*. Расщепление проводили в течение 4 часов при 37°C. После анализа расщепления гель - электрофорезом в 1% агарозном геле, расщепленный вектор выделяли из геля для лигирования с последовательностями 2А пептидов. Реакционная смесь, содержащая 5 нг T2A/E2A последовательности, 50 нг T-pGEM3zf+, базовый раствор для T4 ДНК - лигазы, была инкубирована при комнатной температуре в течение 2 часов. Далее, лигазной смесью проводили трансформацию компетентных клеток Dh5α. Из отобранных колоний выделяли плазмидную ДНК. Анализ рекомбинантных плазмид осуществлялся путем расщепления, для T2A использовали *Cfr9I* и *BglII* эндонуклеазы, а для E2A – *XbaI* и *BglII* ндонуклеазы. Реакционная смесь для T2A объемом 20 мкл содержала 1X *Cfr9I* буфер, 250 нг ДНК, 5 ед. *Cfr9I* и 10 ед. *BglII*. Реакционная смесь для E2A объемом 20 мкл содержала 2X Tango буфер, 250 нг ДНК, 5 ед. *BglII* и 10 ед. *XbaI*. Расщепление проводили в течение 3 часов при 37°C. Результаты расщепления анализировали гель - электрофорезом в 1% агарозном геле. Полученные векторы были маркированы как pGemT2A и pGemE2A.

Секвенирование последовательностей 2А пептидов.

Определение нуклеотидных последовательностей 2А пептидов в отобранных клонах pGemT2A и pGemE2A векторов было осуществлено при использовании M13 обратного праймера, таблица 6. Для работы отбирались клоны, не имеющие мутаций в последовательностях 2А пептидов.

Далее, E2A последовательность из вектора pGemE2A была субклонирована в вектор pGemT2A по сайтам рестрикции *BglII* и *XbaI*. Расщепление pGemE2A и pGemT2A векторов проводилось в 20 мкл реакционной смеси, которая содержала 2X Tango буфер, 500 нг pGemE2A вектора или 200 нг pGemT2A вектора, 5 ед. *BglII* и 10 ед. *XbaI*. После анализа результатов расщепления в 1% агарозном геле, E2A последовательность и расщепленный pGemT2A вектор были выделены из геля и использовались в реакции лигирования. Реакционная смесь для лигирования объемом 10 мкл содержала базовый раствор для T4 ДНК лигазы, 80 нг pGemT2A вектор, 6 нг E2A последовательности. Лигирование проводили в течение 2 часов при комнатной температуре. Далее, лигазной смесью проводили трансформацию клеток Dh5α. Из отобранных колоний проводили выделение плазмидной ДНК.

Отобранные клоны анализировали на наличие E2A последовательности в pGemT2A векторе путем расщепления по сайтам рестрикции *Cfr9I* и *XbaI*. Полученная плаزمида была маркирована как V4T2E2. В полученном векторе V4T2E2, между двумя последовательностями 2A пептидов расположены *NdeI*, *BglII* и *XhoI* рестрикционные сайты для клонирования гетерологичных генов. T2A и E2A последовательности в V4T2E2 были анализированы методом секвенирования при использовании M13 обратного праймера.

2.2.2.4 Клонирование и секвенирование гетерологичного гена

В работе были использованы два гетерологичных гена, ген усиленного зеленого флуоресцентного белка и ген капсидного белка ВХПЛЯ, которые вносились в вирусный вектор для анализа его эффективности. Ген усиленного ЗФБ был амплифицирован при использовании плазмиды p-EGFP-C3 с помощью прямого eGFP-f и обратного eGFP-r праймеров. Амплификацию проводили с помощью *Pfu* - полимеразы. Реакционная смесь содержала базовый раствор для *Pfu* - полимеразы, 0,2 мМ каждого праймера и 30 нг плазмиды p-EGFP-C3. Программа для проведения амплификации состояла из: 1. Общей денатурации при 96°C – 3 мин. 2. Циклирования. 10 циклов: 2а – денатурация при 96°C – 20 сек.; 2б – отжиг праймеров при 50°C – 30 сек.; 2в – элонгация при 72°C – 1 мин. 20 циклов: 2г – денатурация при 96°C – 20 сек.; 2д – отжиг праймеров при 58°C – 30 сек.; 2е – элонгация при 72°C – 1 мин. 3. Финальной элонгации при 72°C – 10 мин.

После проведения амплификации, ПЦР - продукт был анализирован в 1% агарозном геле и выделен из геля.

Для амплификации гена, кодирующего капсидный белок ВХПЛЯ, были использованы зараженные листья яблони, образец 58 (Апорт кроваво - красный (форма 1)) [343]. Для обнаружения ВХПЛЯ были разработаны праймеры, комплементарные к консервативным регионам ОРС капсидного белка, размер ПЦР - продукта составлял 203 п.о. [343, р. 4, 344]. Праймеры для обнаружения ВХПЛЯ: прямой праймер – aCPdet-f; обратный праймер – aCPdet-r. Для данных праймеров была подана заявка на патент (приложение Г). Тотальная РНК выделенная из 58 образца использовалась для получения комплементарной ДНК (кДНК) гена, кодирующего капсидный белок, праймер для проведения обратной транскрипции - aCP-r, таблица 6.

Обратная транскрипция проводилась в 2 этапа. 1 этап - инкубирование с праймером: реакционная смесь объемом 13 мкл содержала 300 нг тотальной РНК; 10мМ обратного праймера, до 13 мкл смесь доводилась деионизированной водой. Реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при 65°C. После этого, реакционную смесь охлаждали во льду. 2 этап – обратная транскрипция: к реакционной смеси из 1 этапа добавляли базовый буфер для обратной транскриптазы. Далее проводили инкубирование при 42°C в течение 1,5 часа. Полученная кДНК использовалась для амплификации со специфичными праймерами (прямой праймер: aCP-f, обратный праймер: aCP-r), таблица 6. Реакционная смесь для амплификации кДНК объемом 25 мкл

содержала: базовый буфер для *Pfu* - полимеразы, 0,2 мМ каждого праймера и 2 мкл кДНК. Программа для проведения амплификации состояла из: 1. Общей денатурации при 96°C – 3 мин. 2. Циклирования. 30 циклов: 2а – денатурация при 96°C – 20 сек.; 2б – отжиг праймеров при 55°C – 30 сек.; 2в – элонгация при 72°C - 1 мин. 3. Финальной элонгации при 72°C – 10 мин.

После проведения амплификации, ПЦР - продукт был анализирован в 1% агарозном геле и выделен из геля.

Ген уЗФБ и КБ ВХПЛЯ были клонированы в V4T2E2 вектор по отдельности. Кроме того, данные гены были клонированы в бинарный вектор pSAMBIA2300 по отдельности и служили положительными контролями экспрессии. pSAMeG - бинарный вектор, несущий уЗФБ ген, pSAMaCP – бинарный вектор, несущий КБ ВХПЛЯ. Амплифицированные гены уЗФБ и КБ ВХПЛЯ, а также V4T2E2 вектор подвергали расщеплению с помощью эндонуклеаз *NdeI* и *XhoI*. Реакционная смесь для рестрикции содержала: 1х О буфер, 5 ед. *NdeI* и 10 ед. *XhoI*, 5 мкл ПЦР-продукта как для гена уЗФБ, так и для гена КБ ВХПЛЯ, 250 нг для V4T2E2 вектора. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 3 часов. Далее, всю смесь вносили в 1% агарозный гель с последующим гель - электрофорезом. После электрофореза, гены были выделены из геля и клонированы в V4T2E2 вектор по сайтам рестрикции *NdeI* и *XhoI*.

Полученные векторы были маркированы как V4T2gfpE2 и V4T2aCPE2 (pGEMK2) [234, с.20], рисунок 18.

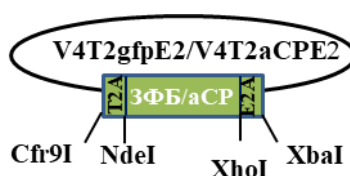


Рисунок 18 – Схематическое изображение векторов V4T2gfpE2 и V4T2aCPE2

V4T2gfpE2 вектор содержал ген усиленного ЗФБ между Т2А и Е2А последовательностями в то время как V4T2aCPE2 вектор между Т2А и Е2А последовательностями содержал ген КБ ВХПЛЯ. Полученные векторы были секвенированы с помощью Т7 прямого и М13 обратного праймеров (таблица 6) для обнаружения мутаций в гетерологичных генах.

2.2.2.5 Клонирование и секвенирование кассеты, несущей гетерологичный ген и 2А последовательности

Кассета, несущая Т2А-еG-Е2А (ЗФБ ген, фланкированный Т2А и Е2А), а также кассета, несущая Т2А-аСР-Е2А (КБ ВПХЛЯ, фланкированный Т2А и Е2А), были субклонированы из векторов V4T2gfpE2 и V4T2aCPE2 соответственно в вектор V1a по сайтам рестрикции *Cfr9I* и *XbaI*. Векторы V4T2gfpE2, V4T2aCPE2 и V1a подвергались расщеплению эндонуклеазами в 20

мкл реакционной смеси, содержащей: 1х *Cfr9I* буфер, 5 ед. *Cfr9I*, 10 ед. *XbaI* и векторы в концентрации 270 нг для V4T2gfpE2 и V4T2aCPE2, 150 нг для V1a вектора. Реакционная смесь инкубировалась при 37°C в течение 4 ч. Результаты расщепления были анализированы методом электрофореза в 1% агарозном геле. Кассеты и расщепленный V1a вектор выделялись из агарозного геля. Далее проводили лигирование кассет и вектора V1a. Реакционная смесь для лигирования объемом 10 мкл содержала: базовый раствор для T4 ДНК лигазы, Каждая кассета в концентрации 300 нг смешивалась с вектором V1a в концентрации 100 нг. Лигирование проводилось при 4°C в течение 14-16 часов. После инкубирования, проводилась трансформация компетентных клеток DH5α лигазной смесью методом теплового шока. Отобранные клоны, вектор V1a, несущий соответствующую кассету, были просеквенированы для анализа мутаций в кассетах. Для секвенирования были использованы прямой праймер - 200709 и обратный праймер - 200710. Полученные векторы в результате лигирования были маркированы как V1aTeGE (y3ФБ), V1aTaCPE (КБ ВХПЛЯ).

2.2.2.6 Сборка модифицированного генома в промежуточном векторе

Для сборки полного модифицированного генома BAB, в вектор V1aTeGE и в вектор V1aTaCPE были субклонированы первые ОРС из вектора CASSgva. Субклонирование было осуществлено по сайтам *PstI*. Вектор V1aTeGE/V1aTaCPE расщепляли по сайту *PstI* в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1X О буфер, 10 ед. *PstI* эндонуклеазы, 200 нг вектора. Смесь выдерживали в термоблоке при 37°C в течение 4 ч. Далее, 2 мкл смеси использовали для анализа результата расщепления методом электрофореза в 1% агарозном геле. 18 мкл смеси было использовано для дефосфорилирования, удаление остатков фосфорной кислоты с 5'- концов порезанного вектора. Дефосфорилирование проводилось для предотвращения самолигирования вектора. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала: базовый раствор для SAP- фосфатазы, 18 мкл расщепленной ДНК, 5 ед. *PstI* эндонуклеазы и 1 ед. SAP- фосфатазы. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 5 часов, далее проводили инактивацию фермента фосфатазы путем нагревания. Смесь инкубировали при 65°C в течение 15 мин, что способствует полной инактивации фосфатазы. После инактивации, смесь в полном объеме наносили в агарозный 1% гель с последующим электрофорезом и выделением дефосфорилированного вектора.

Вектор CASSgva был расщеплен *PstI* эндонуклеазой для получения первых ОРС. Для расщепления была приготовлена реакционная смесь, содержащая 1X О буфер, 10 ед. *PstI* эндонуклеазы, 420 нг вектора. Смесь выдерживали в термоблоке при 37°C в течение 4 ч. Далее, вся смесь была анализирована электрофорезом в 1% агарозном геле. Фрагмент, соответствующий размеру первых ОРС был выделен из геля. Далее проводили лигирование первых ОРС и дефосфорилированного V1aTeGE/V1aTaCPE вектора. Лигирование осуществлялось в 10 мкл реакционной смеси. Реакционная смесь содержала базовый раствор для T4 ДНК лигазы, 140 нг -

V1aTeGE/V1aTaCPE вектора и 70 нг первых ОРС. Для оценки эффективности лигирования был поставлен контроль - лигирование только вектора. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала базовый раствор для Т4 ДНК лигазы, 100 нг - V1aTeGE/V1aTaCPE вектора. Лигирование проводилось в течение 10 часов при 4⁰С. Далее, лигазной смесью проводили трансформацию компетентных клеток DH5 α . Из отобранных клонов выделяли плазмидную ДНК и использовали в анализе наличия первых ОРС. Отобранные клоны для анализа наличия первых ОРС и их ориентации расщеплялись *Cfr9I* и *XbaI* эндонуклеазами, а также анализировались методом ПЦР с использованием праймеров 201364 и 200710, рисунок 19.

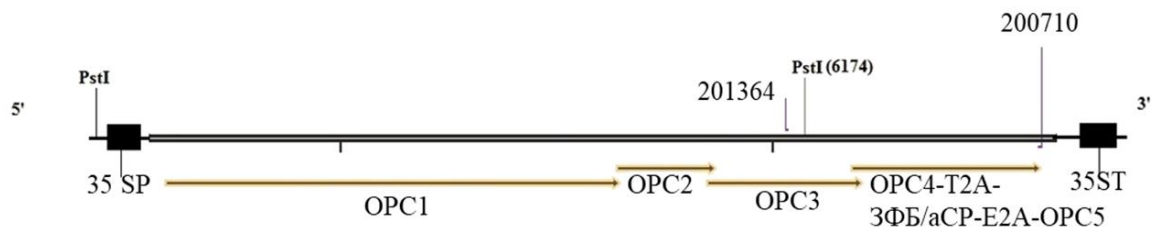


Рисунок 19 – Схематическое изображение расположения праймеров 201364 и 200710

Расщепление проводили в 20 мкл реакционной смеси, которая содержала 1X *Cfr9I* буфер, 220 нг ДНК, 5 ед. *Cfr9I* и 10 ед. *XbaI* эндонуклеазы. Расщепление проводили в течение 3 часов при 37⁰С. Результаты расщепления анализировали гель - электрофорезом в 1% агарозном геле.

Амплификацию с 201364 и 200710 праймерами проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала базовый раствор для *Taq* - полимеразы, 20 нг ДНК, 0,2 мМ каждого праймера. Программа амплификации включала: 1. Общую денатурацию при 96⁰С – 3 мин. 2. Циклирование. 30 циклов: 2а – денатурация при 96⁰С – 20 сек.; 2б – отжиг праймеров при 54⁰С – 30 сек.; 2в – элонгация при 72⁰С - 1 мин. 3. Финальную элонгацию при 72⁰С – 7 мин. Результаты амплификации анализировались гель - электрофорезом в 1% агарозном геле.

Отобранные клоны с правильной ориентацией первых ОРС были маркированы как рCASSTEE (уЗФБ) и рCASSTaCPE (КБ ВХПЛЯ). Для анализа наличия мутаций в области кассеты, было проведено секвенирование при использовании праймеров 200710, 200709, f-mid-GFP для рCASSTEE и 200710, 200709, 201218, f-mid-K2 для рCASSTaCPE. рCASSTEE и рCASSTaCPE векторы были использованы для субклонирования модифицированной части генома ВАВ в бинарный вектор.

2.2.2.7 Субклонирование немодифицированного генома ВАВ в бинарный вектор

Немодифицированный геном ВАВ был субклонирован из рCASSgva в бинарный вектор рCAMBIA 2300 [345, 346] и служил контролем для анализа экспрессии гетерологичных генов в вирусных векторах на основе генома ВАВ.

Создание конструкции pCAMgva

Конструкция состояла из бинарного вектора pCambia 2300 (приложение Д) и полного генома вируса А винограда с фланкирующими его регуляторными последовательностями (35S- промотер, 35S- терминатор). Геном с фланкирующими его регуляторными последовательностями был вырезан из конструкции pCASSgva по сайтам *PvuII*. *PvuII* сайты расположены в pCASS2 векторе, перед 35S- промотором и после 35S- терминатора. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1X G буфер, 250 нг вектора, 2 ед. *PvuII* эндонуклеазы. Бинарный вектор расщеплялся по сайту *Ecl136II*. Для расщепления бинарного вектора, реакционная смесь объемом 20 мкл содержала *Ecl136II* буфер, 200 нг вектора и 5 ед. *Ecl136II* эндонуклеазы. Результаты расщепления для pCASSgva и pCambia 2300 анализировали гель - электрофорезом в 1% агарозном геле. Лигирование проводили в 10 мкл реакционной смеси, которая содержала: 200 нг pCambia 2300 (*Ecl136II*) и 230 нг немодифицированного генома ВАВ, базовый раствор для Т4 ДНК лигазы. Смесь инкубировалась в течение 14-16 часов при +4⁰С. Реакционная смесь использовалась для трансформации компетентных клеток DH5α. Полученные клоны были проверены на наличие генома ВАВ с помощью ПЦР метода при использовании 200709 и 200710 праймеров [347], а также с помощью расщепления по сайтам *PstI*. Праймер 200709 комплементарен 3'-последовательности OPC4, а 200710 праймер комплементарен 3'-последовательности OPC5. Праймеры разрабатывались к консервативным участкам OPC4 и OPC5 ВАВ. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала базовый раствор для *Taq* - полимеразы, 0,2 мМ каждого праймера, 30 нг ДНК. Программа для амплификации включала: 1. Общую денатурацию при 96⁰С – 3 мин. 2. Циклирование. 30 циклов: 2а – денатурация при 96⁰С – 20 сек.; 2б – отжиг праймеров при 60⁰С – 30 сек.; 2в – элонгация при 72⁰С - 40 сек. 3. Финальную элонгацию при 72⁰С – 5 мин. Результаты амплификации анализировались гель - электрофорезом в 1% агарозном геле.

Анализ клонов путем расщепления по *PstI* сайтам проводился в 20 мкл реакционной смеси, которая содержала 1X O буфер, 10 ед. *PstI* эндонуклеазы, 200 нг ДНК. Смесь выдерживали в термоблоке при 37⁰С в течение 4 ч. Далее, вся смесь была анализирована электрофорезом в 1% агарозном геле.

2.2.2.8 Сборка модифицированного генома ВАВ в бинарном векторе

Модифицированный геном ВАВ из pCASSTEE и pCASSTaCPE был субклонирован в вектор pCAMgva. Клонирование было осуществлено по сайтам *AatII* и *SalI* [234, с. 20]. Сайт *AatII* расположен ближе к 3'- концу OPC1, 5050 п.о. относительно генома ВАВ. Сайт *SalI* находится перед 35S терминатором, в векторе pCASS2. Расщепление pCASSTEE, pCASSTaCPE и pCAMgva, каждого в отдельности, было осуществлено в 2 этапа. Первый этап: 20 мкл реакционной смеси, которая содержала 1x Tango буфер, 250 нг вектора, 10 ед. *AatII*, инкубировали в течение 3 ч при 37⁰С. Далее, 2 мкл смеси

использовали для анализа гелем - электрофорезом в 1% агарозном геле. Оставшуюся смесь подвергали очистке методом осаждения этанолом в присутствии солей. К реакционной смеси добавляли 1.8 мкл 3М ацетата калия и 2.5 объема 96% этанола. Смесь выдерживалась 15 мин при -80°C , далее проводили осаждение путем центрифугирования в течение 15 мин при 12 000 оборотах. После осаждения, супернатант сливали, а к осадку добавляли 200 мкл 75% этанола. Проводили центрифугирование в течение 15 мин при 10 000 оборотах. Осадок высушивали при комнатной температуре и разводили в 17 мкл деионизированной воды. 2 этап заключался в расщеплении вектора с помощью второй эндонуклеазы *SalI*. 20 мкл реакционной смеси содержало: 17 мкл расщепленного вектора из 1-го этапа, 1X O буфер, 10 ед. *SalI* эндонуклеазы. Смесь выдерживали в термоблоке при 37°C в течение 4 ч. Далее, вся смесь была анализирована гелем - электрофорезом в 1% агарозном геле. Из геля были вырезаны фрагменты, соответствующих размеров, и лигированы. Лигирование осуществлялось для pCAMgva и модифицированного фрагмента из pCASSTEE, а также для pCAMgva и модифицированного фрагмента из pCASSTaCPE. Реакционная смесь для лигирования объемом 10 мкл содержала: 150 нг вектора, 150 нг фрагмента, состоящего из модифицированного генома ВАВ, базовый раствор для Т4 ДНК лигазы. Реакционная смесь выдерживалась при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 14-16 часов. Далее, лигазной смесью проводили трансформацию компетентных клеток DH5 α . Анализ отобранных клонов, на наличие модифицированной части генома ВАВ в pCAMgva векторе проводился с помощью амплификации при использовании aCP-f и aCP-r праймеров для КБ ВХПЛЯ, а также eGFP-f и eGFP-r праймеров для уЗФБ. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: базовый раствор для *Taq* - полимеразы, 0,2 мМ каждого праймера, 20 нг ДНК. Программа для амплификации включала: 1. Общую денатурацию при 96°C – 3 мин. 2. Циклирование. 30 циклов: 2а – денатурация при 96°C – 20 сек.; 2б – отжиг праймеров при 60°C – 30 сек.; 2в – элонгация при 72°C - 1.5 мин. 3. Финальную элонгацию при 72°C – 7 мин. Результаты амплификации анализировались гелем - электрофорезом в 1% агарозном геле. Полученные векторы были маркированы как pCAMV1aTeGE и pCAMV1aTaCPE.

2.2.3 Разработка вектора путем деконструирования генома ВАВ. Замена ORC4 на гетерологичный ген

Для разработки вирусного вектора на основе деконструктивного генома ВАВ, была использована плазида pCASSgva. Стратегия разработки вектора заключалась в замене ORC4 ВАВ на гетерологичный ген. Гетерологичный ген находился под контролем субгеномного промотора КБ ВАВ и в рамке считывания с ORC5 [348].

Область перекрытия ORC3 и ORC4 оставалась интактной. Для удаления аминокислотной последовательности области перекрытия (N-конца КБ ВАВ) и для отделения гетерологичного белка от белка Р10, были внесены последовательности 2А пептидов. Т2А последовательность была внесена

между областью перекрытия и гетерологичным геном, E2A последовательность была внесена между OPC5 и гетерологичным геном. Стоп-кодона у гетерологичных генов были удалены. Модифицированный геном ВАВ в дальнейшем был субклонирован в бинарный вектор pSAMgva для агробактериальной доставки в растения. Эффективность вирусного вектора была анализирована путем внесения гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок и гена, кодирующего капсидный белок вируса хлоротической пятнистости листьев яблони, данные гены вносились по отдельности.

2.2.3.1 Дизайн праймеров для сайт - направленного мутагенеза генома ВАВ. Удаление OPC4

Удаление OPC4 осуществлялось с помощью ПЦР при использовании специфичных праймеров. Праймер 201267 комплементарен к OPC5 и на своем 5'-конце несет сайты рестрикции *Bgl*III и *Xba*I. Праймер 201268 (таблица 6), комплементарен области перекрытия OPC3 с OPC4 и на своем 5'-конце несет *Bgl*III и *Cfr*9I сайты рестрикции, рисунок 20. С помощью праймеров 201267 и 201268 вносятся сайты рестрикции *Cfr*9I и *Xba*I для клонирования кассет, несущих гетерологичный ген, который фланкирован последовательностями 2А пептидов. Матрицей послужил вектор V1, подглава – Удаление первых OPC и внесение рестрикционных сайтов между OPC4 и OPC5 генома ВАВ. Для амплификации, реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: базовый раствор для *Pfu* - полимеразы, 30 нг ДНК, 0,2 мМ каждого праймера.

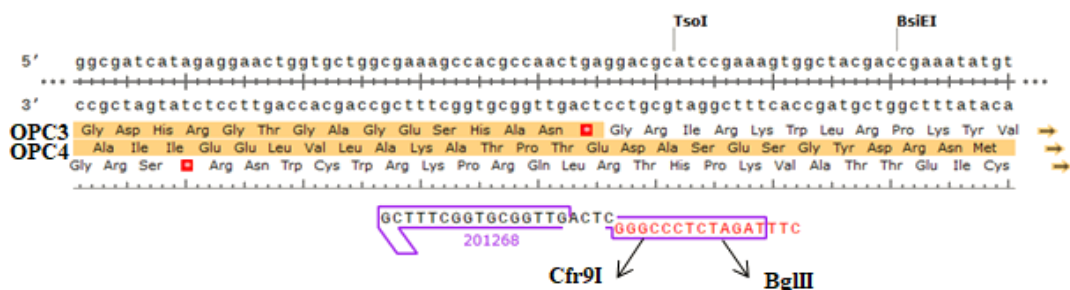


Рисунок 20 – Иллюстрация области перекрытия OPC3 и OPC4 ВАВ

Программа для амплификации включала: 1. Общую денатурацию при 96°C – 3 мин. 2. Циклирование. 30 циклов: 2а – денатурация при 96°C – 20 сек.; 2б – отжиг праймеров при 50°C – 30 сек.; 2в – элонгация при 72°C - 5 мин. 3. Финальную элонгацию при 72°C – 15 мин. Результаты амплификации анализировались гель - электрофорезом в 1% агарозном геле, для анализа использовалось 2 мкл смеси. Оставшуюся реакционную смесь подвергали гидролизу эндонуклеазой *Dpn*I. Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала базовый раствор для эндонуклеазы *Dpn*I, 23 мкл ПЦР - продукта. Инкубирование проводили при 37°C в течение 1 часа. Инактивацию фермента осуществляли путем нагревания при 80°C в течение 20 минут. Далее, ПЦР -

продукт выделяли из геля и подвергали расщеплению эндонуклеазой *BglII*. Расщепление проводили в 20 мкл реакционной смеси, которая содержала: 1X О буфер, 200 нг ДНК и 5 ед. *BglII* эндонуклеазы. Инкубирование проводили при 37°C в течение 2 часов. После инкубирования, проводился гель - электрофорез в 1% агарозном геле и ДНК выделяли из геля для лигирования. Лигирование проводили в 10 мкл реакционной смеси, которая содержала: базовый раствор для Т4 ДНК лигазы, 70 нг ДНК. Инкубирование лигазной смеси осуществляли при комнатной температуре в течение 2 часов. Далее лигазной смесью трансформировали компетентные клетки DH5α. Отобранные колонии, выросшие на твердой ЛБ среде, инокулировали в жидкую ЛБ среду с последующим выделением плазмидной ДНК. Полученный вектор был маркирован как V1b. Отобранные клоны V1b вектора использовались для внесения кассеты, содержащей 2A последовательности и гетерологичного гена между ними.

Анализ клонов на наличие сайтов рестрикции проводился путем расщепления отобранных клонов *BglII* и *PstI* эндонуклеазами. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 1X О буфер, 120 нг ДНК, 3 ед. *BglII* и 3 ед. *PstI*. Инкубирование проводили при 37°C в течение 3 часов. Результаты расщепления проверяли гель - электрофорезом в 1% агарозном геле.

Анализ модифицированной части генома в отобранных после расщепления клонах V1b вектора проводился путем секвенирования при использовании праймера 200710.

Кассеты, несущие гетерологичный ген, фланкированный последовательностями 2A пептидов, были получены из векторов V4T2gfpE2 и V4T2aCPE2 (2.2.1.4 Клонирование и секвенирование гетерологичного гена).

2.2.3.2 Субклонирование кассеты, несущей гетерологичный ген и 2A последовательности

Кассета, несущая T2A-eG-E2A (уЗФБ ген фланкированный T2A и E2A последовательностями), а также кассета, несущая T2A-aCP-E2A (КБ ВПХЛЯ ген фланкированный T2A и E2A последовательностями), были субклонированы из векторов V4T2gfpE2 и V4T2aCPE2 соответственно в вектор V1b по сайтам рестрикции *Cfr9I* и *XbaI*, рисунок 19. Векторы V4T2gfpE2, V4T2aCPE2 и V1b подвергались расщеплению эндонуклеазами в 20 мкл реакционной смеси, содержащей: 1x *Cfr9I* буфер, 5 ед. *Cfr9I*, 10 ед. *XbaI*, V4T2gfpE2/V4T2aCPE2 вектор в концентрации 300 нг, а вектор V1b в концентрации 150 нг. Реакционная смесь инкубировалась при 37°C в течение 4 ч. Результаты расщепления были анализированы методом электрофореза в 1% агарозном геле. Кассеты и расщепленный V1b вектор выделялись из агарозного геля. Далее проводили лигирование кассет и вектора V1b. Каждая кассета в концентрации 250 нг смешивалась с вектором V1b в концентрации 100 нг. Лигирование проводилось при 4°C в течение 14-16 часов. После инкубирования, проводилась трансформация компетентных клеток DH5α лигазной смесью методом теплового шока. Далее проводили выделение

плазмидной ДНК из клеток с последующим анализом отобранных клонов на наличие кассет. Анализ проводился при использовании ПЦР - метода со специфичными праймерами для уЗФБ (eGFP-f, eGFP-r) и для КБ ВХПЛЯ (aCPdet-f, aCPdet-r). Отобранные клоны, вектор V1b, несущий соответствующую кассету, были просеквенированы для анализа мутаций в кассетах. Для секвенирования были использованы прямой праймер – 200709 и обратный праймер – 200710. Полученные векторы в результате лигирования были маркированы как V1bTeGE (уЗФБ), V1bTaCPE (КБ ВХПЛЯ).

2.2.3.3 Сборка модифицированного генома в бинарном векторе

Для сборки полного модифицированного генома VAB, в вектор V1bTeGE и в вектор V1bTaCPE были субклонированы первые ОРС из вектора CASSgva. Субклонирование было осуществлено по сайтам *PstI*. Вектор V1bTeGE/V1bTaCPE расщепляли по сайту *PstI* в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1X О буфер, 5 ед. *PstI* эндонуклеазы, 200 нг вектора. Смесь выдерживали в термоблоке при 37°C в течение 4 ч. Далее, 2 мкл смеси использовали для анализа результата расщепления методом электроофреза в 1% агарозном геле. 18 мкл смеси было использовано для дефосфорилирования, удаление остатков фосфорной кислоты с 5'- концов порезанного вектора. Дефосфорилирование проводилось для предотвращения самолигирования вектора. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала: базовый раствор для SAP - фосфатазы, расщепленную ДНК- 18 мкл из реакции рестрикции, 5 ед. *PstI* эндонуклеазы и 1 ед. SAP - фосфатазы. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 10 часов, далее проводили инактивацию фермента фосфатазы путем нагревания. После инактивации, ДНК очищалась путем осаждения этанолом в присутствии солей. Осадок разводился в 20 мкл деионизированной воды.

Вектор CASSgva был расщеплен *PstI* эндонуклеазой для получения первых ОРС. Для расщепления была приготовлена реакционная смесь, содержащая 1X О буфер, 5 ед. *PstI* эндонуклеазы, 350 нг вектора. Смесь выдерживали в термоблоке при 37°C в течение 4 ч. Далее, вся смесь была анализирована гель - электрофорезом в 1% агарозном геле. Фрагмент, соответствующий размеру первых ОРС и 35S промотору (7200 п.о.) был выделен из агарозного геля. Далее проводили лигирование первых ОРС и дефосфорилированного вектора V1bTeGE/V1bTaCPE. Лигирование осуществлялось в 10 мкл реакционной смеси. Реакционная смесь содержала базовый раствор для Т4 ДНК лигазы, 70 нг вектора V1bTeGE/V1bTaCPE и 200 нг ДНК, соответствующей ОРС и 35S промотору. Инкубирование проводили при 4°C в течение 16 часов. Для оценки эффективности лигирования, был поставлен контроль - лигирование только вектора. Лигазной смесью проводили трансформацию клеток DH5α. Отобранные клоны анализировались на наличие первых ОРС и ориентации первых ОРС методом ПЦР с использованием праймеров 201364 и 200710. Амплификацию с 201364 и 200710 праймерами проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала базовый раствор

для *Taq* - полимеразы, 20 нг ДНК, 0,2 мМ каждого праймера. Программа амплификации включала: 1. Общую денатурацию при 96°C – 3 мин. 2. Циклирование. 30 циклов: 2а – денатурация при 96°C – 20 сек.; 2б – отжиг праймеров при 54°C – 30 сек.; 2в – элонгация при 72°C - 1 мин. 3. Финальную элонгацию при 72°C – 7 мин. Результаты амплификации анализировались гель - электрофорезом в 1% агарозном геле.

Отобранные клоны с правильной ориентацией первых ОРС были маркированы как pCASSv1bTEE и pCASSv1bTaCPE. Для анализа наличия мутаций в области кассеты было проведено секвенирование при использовании праймеров 200710, 201364, f-mid-GFP для pCASSv1bTEE и 201210, 201364, f-mid-K2 для pCASSv1bTaCPE. Модифицированный геном ВАВ из pCASSv1bTEE и pCASSv1bTaCPE был субклонирован в вектор pCAMgva. Клонирование было осуществлено по сайтам *AatII* и *Sall*. Расщепление pCASSv1bTEE, pCASSv1bTaCPE и pCAMgva, каждого в отдельности, было осуществлено в 2 этапа. Первый этап: 20 мкл реакционной смеси, которая содержала 1х Tango буфер, 250 нг вектора, 10 ед. *AatII*, инкубировали в течение 3 ч при 37°C. Далее, 2 мкл смеси использовали для анализа гель - электрофорезом в 1% агарозном геле. Оставшуюся смесь подвергали очистке методом осаждения этанолом в присутствии солей. Осадок высушивали при комнатной температуре и разводили в 17 мкл деионизированной воды. 2 этап заключался в расщеплении вектора с помощью второй эндонуклеазы *Sall*. 20 мкл реакционной смеси содержало: 17 мкл расщепленного вектора из 1-го этапа, 1X О буфер, 5 ед. *Sall* эндонуклеазы. Смесь выдерживали в термоблоке при 37°C в течение 4 ч. Далее, вся смесь была анализирована гель - электрофорезом в 1% агарозном геле. Из геля были вырезаны фрагменты, соответствующих размеров, и лигированы. Лигирование осуществлялось для pCAMgva и фрагмента генома ВАВ из pCASSv1bTEE, а также для pCAMgva и фрагмента генома ВАВ из pCASSv1bTaCPE. Реакционная смесь для лигирования объемом 10 мкл содержала: 100 нг вектора, 70 нг фрагмента, состоящего из модифицированного генома ВАВ, базовый раствор для Т4 ДНК лигазы. Реакционная смесь выдерживалась при +4°C в течение 14-16 часов. Далее, лигазной смесью проводили трансформацию компетентных клеток DH5α. Анализ отобранных клонов на наличие модифицированного генома ВАВ проводился методом ПЦР с использованием специфичных праймеров к уЗФБ (eGFP-f, eGFP-r) и к КБ ВХПЛЯ (aCPdet-f, aCPdet-r). Полученные векторы были маркированы как pCAMV1bTeGE (уЗФБ) и pCAMV1bTaCPE (КБ ВХПЛЯ).

2.2.4 Разработка трансгенных растений *Nicotiana benthamiana*, несущих ген капсидного белка ВАВ

Для повышения количества гетерологичного белка в растениях при экспрессии гетерологичных генов с помощью деконструированного вирусного вектора были разработаны трансгенные растения, несущие ген КБ ВАВ [349]. Стабильная трансформация осуществлялась с помощью агробактерий. Для

внесения гена КБ ВАВ в геном растений, ген КБ изначально был клонирован в бинарный вектор pBI121 (приложение Е) по сайтам рестрикции *XbaI* и *SacI*. Для амплификации гена КБ использовался вектор pCASSgva и праймер ORF4-f (5'-CAGAAGTTTTCTAGACAATAAAGAGACTTG-3'), а также праймер ORF4-r (5'-ACGATGGGTCGAGCTCCTATATCTCG-3'). Праймер ORF4-f расположен 6371-6400 п.о относительно генома ВАВ, в то время, как праймер ORF4-r расположен 7025 – 7000 п.о относительно генома ВАВ. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала базовый раствор для рfu - полимеразы, 0,2 мМ каждого праймера, 30 нг вектора pCASSgva. Программа амплификации включала: 1. Общую денатурацию при 96°C – 3 мин. 2. Циклирование. 30 циклов: 2а – денатурация при 96°C – 20 сек.; 2б – отжиг праймеров при 52°C – 30 сек.; 2в – элонгация при 72°C – 40 сек. 3. Финальную элонгацию при 72°C – 5 мин. Результаты амплификации анализировались гель - электрофорезом в 1% агарозном геле.

После амплификации, ген КБ был клонирован в Т-pGEM3zf+ методом Т/А, с получением вектора pGEMCP. Лигирование проводили в 10 мкл реакционной смеси, которая содержала базовый раствор для Т4 ДНК лигазы, 70 нг вектора Т-pGEM3zf+, расщепленного по сайту *Eam1105I* (Клонирование последовательностей 2А пептидов в Т-pGEM3zf+), 70 нг амплифицированного гена КБ ВАВ. Инкубирование реакционной смеси проводили в течение 2 часов при комнатной температуре. Далее проводили трансформацию компетентных клеток DH5α лигазной смесью. Анализ отобранных клонов на наличие гена КБ ВАВ проводился ПЦР - методом со специфичными праймерами ORF4-f и ORF4-r. Ген КБ ВАВ в отобранных клонах вектора pGEMCP был секвенирован при использовании Т7 - прямого и М13 - обратного праймеров. Далее, КБ ген субклонировали в бинарный вектор pBI121 с получением вектора pBIsr. Субклонирование проводилось по сайтам *XbaI* и *SacI*. pGEMCP и pBI121 расщеплялись по отдельности в 20 мкл реакционной смеси, которая содержала 1X Tango буфер, 350 нг ДНК для pGEMCP, 300 нг ДНК для pBIsr, 5 ед. *XbaI* и 10 ед. *SacI*. Расщепление проводили в течение 3 ч. при 37°C. Далее, анализ расщепления проводился методом гель - электрофореза в 1% агарозном геле. Целевые ДНК выделялись из геля и использовались в лигировании. Лигирование проводили в 10 мкл реакционной смеси, которая содержала базовый раствор для Т4 ДНК лигазы, 80 нг вектора и 20 нг гена КБ ВАВ. Инкубацию проводили в течение 16 ч. при 4°C. Далее лигазной смесью проводили трансформацию компетентных клеток DH5α. Отобранные клоны были анализированы путем расщепления по сайтам *XbaI* и *SacI*. Отобранные клоны pBIsr вектора были использованы для трансформации компетентных клеток агробактерий методом замораживания/оттаивания.

2.2.4.1 Трансформация растений путем использования агробактерий

Приготовление стерильных растений *Nicotiana benthamiana*. Семена растений обрабатывались 10% раствором отбеливателя с добавлением 0,1 % Tween 20 в течение 20 мин. Далее, семена промывались стерильной водой 5 раз

по 2 мин. После промывания, 10-15 семян располагали в боксы размером 77 мм × 77 мм × 97 мм (Magenta бокс), содержащих твердую MSgr среду. Растения из семян выращивали в течение 3-4 недель при 28°C и 16 часовом световом периоде. Растения, имеющие 5-6 листков, использовались для получения эксплантов.

Приготовление агробактерий для совместного культивирования с эксплантами. Отобранные клоны агробактерий, несущие вектор pVIsr, инокулировали в 5 мл ЛБ среды, содержащей канамицин (50 мкг/мл) и рифампицин (25 мкг/мл). 150-300 мкл ночной культуры инокулировали в 30 мл жидкой MScr среды, содержащей ацетосирингон (0,2 мМ) и без антибиотиков. MScr среду с агробактериями выдерживали в темноте в течение 1 часа. Далее, экспланты листков табака, размером 1 см², помещали в данную среду и выдерживали в течение 15 минут. После этого, экспланты располагали на чашках Петри, содержащих твердую MScr среду для ко-культивирования. Перед ко-культивирования, твердую среду слегка разрыхляли стерильными щипцами, экспланты помещали не на поверхность среды, а слегка погружали в среду. 5 эксплантов располагали на одной чашке Петри. Чашки Петри закрывались, обматывались парафином и выдерживались в течение 24 ч в темноте. Далее, чашки Петри с эксплантами выдерживались при 16-часовом световом периоде с освещением в 70 μmol m⁻² sec⁻², в течение 4-6 дней. Температура воздуха составляла 28°C. Ежедневно проверялся уровень роста агробактерий, в случае чрезмерного роста агробактерий, экспланты пересаживались на свежую питательную среду, содержащую дополнительно канамицин (100 мкг/мл) и тиментин (300 мкг/мл). Культивирование эксплантов на среде с антибиотиками осуществлялась в течение 10-20 дней, далее, экспланты снова пересаживались на свежую питательную среду, и культивировались несколько недель, за это время происходило формирование каллуса. Побег, достигший 2-3 см в длину, пересаживался в Magenta бокс с твердой MSgr средой, содержащую антибиотики канамицин (100 мкг/мл) и тиментин (300 мкг/мл), для формирования корней. Побег аккуратно отделялся от каллуса и нижних листков с помощью стерильного скальпеля. 4 побега располагали в один Magenta бокс. Корни начали формироваться через 3-4 недели культивирования. После формирования 3-5 корней длиной 2 см, регенеранты готовили для пересадки в почву.

Перенос регенерантов в почву. Регенеранты были подготовлены к *ex-vitro* условиям в соответствии с методикой Бурова (335). Жидкая Мурасиге - Скуга среда (1/10 МС без витаминов и углеводов) разливалась в Magenta боксы, заполнялась 1/6 бокса. Регенеранты промывались под струей водопроводной воды и погружались в МС среду. После этого Magenta боксы плотно закрывались крышками и выдерживались 24 часа. Далее, крышки боксов открывали для адаптации растений к условиям окружающей среды. В МС среде растения выдерживались в течение 3-4 дней. После этого регенеранты были перенесены в почву. Предварительно почва была термически обработана при 100°C в течение 3 часов в сушильном шкафу. Растения, перенесенные в почву,

накрывались пластиковыми колпаками с отверстиями для прохождения воздуха. Накрытие растений препятствовало увяданию. Растения поливались 4 раза в неделю. После адаптации регенерантов к почве, пластиковые колпаки убирались, и полив сокращался до 2 раз в неделю. Перед появлением цветков, растения накрывались полиэтиленовыми файлами для предотвращения перекрестного опыления. После самоопыления, семена собирались в пробирки и хранились при 4°C в холодильнике.

2.2.4.2 Проверка семян на наличие трансгена

Для определения гомозиготных трансгенных линий, семена растений T1 и T2 поколений сеяли на чашки Петри, содержащие MSgr среду с канамицином (300 мкг/мл). Трансгенные гомозиготные семена давали рост полноценным растениям, в то время как нетрансгенные семена не способны были к герменации вообще. Гетерозиготные линии давали небольшие побеги, которые в дальнейшем обесцвечивались и погибали. Растения T1 и T2 поколений были проверены на трансгенность с помощью ПЦР - анализа и вестерн блоттингом. Для анализа R0, T1 и T2 регенерантов с помощью ПЦР - анализа, геномная ДНК растений была выделена с помощью СТАВ метода (336). 100 мг свежих листьев табака гомогенизировали в 1 мл СТАБ - буфера (2% СТАБ; 1.4 M NaCl; 100 mM трис-HCl, pH 8.0; 20 mM ЭДТА; 0.2 % 2-меркаптоэтанол; 1% поливинилпирролидон; 1% Na₂SO₃). Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 60°C. Каждые 10 мин пробирки переворачивали вверх-вниз для перемешивания гомогената. После инкубирования, добавляли 1 мл хлороформ:изоамиловый спирт (24:1) и проводили центрифугирование в течение 15 мин при 13 тыс об., комнатная температура. Водную надосадочную фазу отбирали в новую пробирку, к которой добавляли 0,5 объема 5M NaCl и 2,5 объема 96% спирта. Далее проводили инкубирование в течение 20 мин при 4°C. После инкубирования, ДНК осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 13 тыс. об.. Супернатант удалялся, а к осадку добавляли 200 мкл 75% спирта. Далее проводили центрифугирование в течение 15 мин при 13 тыс. оборотов. Супернатант удалялся, а осадок высушивался при комнатной температуре. Высушенный осадок разводился в 40 мкл деионизированной воды. ПЦР проводили со специфичными праймерами ORF4-f и ORF4-r. Вестерн блоттинг был проведен для растений T2, перед их агроинфильтрацией разработанным деконструктивным вектором.

2.2.5 Трансформация агробактерий разработанными векторами

pCAmV1aTeGE, pCAMV1aTaCPE, pCAmV1bTeGE, pCAMV1bTaCPE, pCAMaCP, pCAMeG векторы, а также pCAMgva вектор были использованы для трансформации агробактерий методом замораживания/оттаивания. pCAMgva, pCAMaCP, pCAMeG векторы были использованы как контроли экспрессии гетерологичных генов в вирусных векторах на основе генома ВАВ.

Отобранные колонии агробактерий проверялись на наличие конструкций методом ПЦР с праймерами 200709 и 200710 для pCAmV1aTeGE,

pCAMV1aTaCPE, pCAMgva векторов, для pCAmV1bTeGE, pCAMeG векторов – eGFP-f и eGFP-r праймеры, для pCAMV1bTaCPE и pCAMaCP векторов – aCPdet-f и aCPdet-r праймеры.

2.2.6 Агробактериальная инфильтрация листьев *Nicotiana benthamiana*

Отобранные колонии агробактерий, несущие конструкции pCAMgva, pCAmV1aTeGE, pCAMV1aTaCP, pCAmV1bTeGE, pCAMV1bTaCPE, pCAMaCP, pCAMeG векторы были заморожены в 15% глицерине на -80°C. Инокуляция агробактерий из глицеринового стока производилась в размере одной полной петли в 5 мл жидкой ЛБ среды с канамицином и рифампицином. Инокулированные агробактерии растили в течение 12 часов при 28°C в термошейкере. После чего, клетки осаждались центрифугированием при 4 тыс. оборотов в течение 5 минут и осадок разводился в 1 мл жидкой МС среды содержащей ацетосерингон (0,2 мМ). Далее проводили осаждение при тех же условиях. Полученный осадок разводился в новой среде МС + ацетосерингон (0,2 мМ) до достижения ОД 0,3. Разведенный осадок инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре в темноте. После чего проводили агроинфильтрацию растений табака с помощью шприцов без иглоек. Агроинфильтрации подвергались растения, имеющие 4-6 листьев. Заражались 2 нижних листа расположенных напротив друг друга.

2.2.7 Анализ РНК и белков из зараженных и системных листьев табака

РНК из зараженных и верхних системных листьев растений выделялась на 3-4 день и на 10-15 день соответственно после агроинфильтрации векторами, основанных на полном геноме ВАВ (pCAmV1aTeGE и pCAMV1aTaCPE), pCAMgva с помощью набора реагентов GeneJET Plant RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Выделение РНК проводилось в соответствии с протоколом производителя. Для векторов, разработанных путем деконструирования генома ВАВ (pCAmV1bTeGE и pCAMV1bTaCPE) и pCAMgva, РНК выделяли из зараженных листьев на 3-4 день после агроинфильтрации.

Нозерн блоттинг проводился со специфичной РНК пробой, комплементарной плюс цепи OPC5.

Для получения РНК пробы к OPC5, готовился вектор, содержащий последовательность OPC5. Последовательность OPC5 была субклонирована из вектора pCASSgva в вектор pGEM3zf+ по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Sal*I. pCASSgva и pGEM3zf+ расщеплялись по отдельности в 20 мкл реакционной смеси, которая содержала 1X *Bam*HI буфер, 340 нг ДНК для pCASSgva вектора, 200 нг ДНК для pGEM3zf+ вектора, 5 ед. *Bam*HI и 10 ед. *Sal*I эндонуклеаз. Реакционная смесь инкубировалась в течение 3 часов при 37°C. Далее, результаты расщепления анализировались гель - электрофорезом в 1% агарозном геле с последующим выделением целевых продуктов из геля. Лигирование OPC5 и расщепленной pGEM3zf+ плазмиды проводили в 10 мкл реакционной смеси, которая содержала базовый раствор для T4 ДНК лигазы, 80

нг вектора и 40 нг OPC5. Лигирование проводили при комнатной температуре в течение 2 часов. Далее лигазной смесью трансформировали компетентные клетки DH5 α . Отобранные клоны проверяли на наличие OPC5 путем расщепления по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Sal*I. Полученный вектор был маркирован как GR-40.

Вектор GR-40 расщеплялся по сайту рестрикции *Bam*HI для получения линейного вектора и ингибирования транскрипции *in-vitro*. Расщепление проводили в 400 мкл реакционной смеси, которая содержала 1 мкг вектора, 1X *Bam*HI буфера, 20 ед. *Bam*HI. Реакционная смесь выдерживалась при 37 $^{\circ}$ C в течение 3 ч. Далее проводили очистку расщепленного вектора фенолом/хлороформом. 400 мкл 1:1 фенол/хлороформа добавлялось к 400 мкл реакционной смеси. Полученную смесь тщательно перемешивали и центрифугировали при 10 тыс. оборотов в течение 15 мин. Водную фазу отбирали в новую 1,5 мл пробирку и ДНК осаждали этанолом в присутствии солей. Осадок разводили в 30 мкл деионизированной воды.

In-vitro транскрипция. Получение специфичной РНК пробы. Транскрипцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, которая содержала 5 мкл очищенного расщепленного GR-40 вектора, 1X буфера для транскрипции (200 mM Трис-HCl (pH 7.9 при 25 $^{\circ}$ C), 30 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 50 mM NaCl, 10 mM спермидин), 2 мкл набора – DIG RNA Labeling Kit (Sigma-Aldrich), содержащего меченный дигоксигенином урацил, 2 мкл SP6 – полимеразы (Thermo Fisher Scientific), 0,5 мкл ингибитора рибонуклеаз – Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen). Реакционную смесь инкубировали при 37 $^{\circ}$ C в течение 2 ч. Далее, к смеси добавляли 1 мкл ДНКазы I (DNase I Solution (2500 U/mL), Thermo Fisher Scientific) и смесь выдерживали в течение 30 мин при 37 $^{\circ}$ C. Далее очищали РНК путем добавления 6 мкл 8M LiCl, 300 мкл 96% спирта. Полученную смесь выдерживали в течение 16 ч при -20 $^{\circ}$ C. Осаждение РНК проводили путем центрифугирования при 13 тыс. оборотов и 4 $^{\circ}$ C в течение 15 мин. Супернатант удалялся и к осадку добавлялось 1 мл 75% холодного спирта. Далее проводили центрифугирование при 13 тыс. оборотов и 4 $^{\circ}$ C в течение 10 мин. Супернатант сливался и осадок высушивался при комнатной температуре с последующим разведением в 100 мкл деионизированной воды. Для гибридизации отбиралось 30 мкл полученной РНК пробы.

Гель - электрофорез РНК в агарозном геле.

2500 нг тотальной РНК каждого образца использовалось для проведения геля - электрофореза в 1% агарозном геле. Агарозный гель готовился в 100 мл раствора, который содержал 1 г агарозы, 10 мкл 10X MOPS (0.2 M MOPS, 50 mM ацетат натрия, 10mM EDTA, pH 7.0), 5,1 мл 37% формальдегида. Гель помещался в камеру для электрофореза (Wide Mini ReadySub-Cell™, Bio-Rad), которая содержала 1X MOPS. К образцам РНК добавлялся 17 мкл денатурирующего буфера (1X MOPS, 50% формамид, 2,2 M формальдегид). Образцы РНК в денатурирующем буфере нагревались при 65 $^{\circ}$ C в течение 10 мин, после чего помещались в лед. Перед внесением образцов в гель к образцам

добавлялось 2 мкл 10X бромфенолового буфера (50% глицерин, 0,3% бромфеноловый синий). Электрофорез проводился при 60В в течение 2 часов.

Перенос РНК на мембрану [350]. Перенос РНК осуществлялся капиллярными силами. Готовился мост из ватман, концы которого были опущены в 20X SSC буфер (3М NaCl, 0,3М цитрат натрия). На ватман помещался агарозный гель с разделенными РНК, сверху геля размещали нитроцеллюлозную мембрану (размер пор 0.45 мкм, размер 20 см × 20 см, Sigma-Aldrich). Мембрана предварительно смачивалась в 20X SSC буфере. На мембрану накладывали 3 листа ватман, сверху ватман листов располагали упаковку тканевых салфеток (KLEENEX ULTRA). На салфетки был расположен груз весом 0,5 кг. Перенос осуществлялся в течение 16 часов при комнатной температуре. После переноса, проводили фиксирование РНК на мембране путем выдерживания мембраны под ультрафиолетом в течение 3 мин.

Гибридизация вирусных РНК со специфичной РНК пробой. Для проведения гибридизации приготавливались следующие растворы:

- 5X Малеатный раствор: раствор готовился в 1 литре и содержал 58 г малеиновой кислоты, 43,85 г NaCl, pH раствора доводился NaOH до 7,5.

- Блокирующий раствор: раствор готовился в 500 мл и содержал 50 г казеина, 500 мл 5X малеатного раствора. Перед употреблением раствор автоклавировался.

- Блокирующий буфер: буфер готовился в 20 мл и содержал 10 мл блокирующего раствора и 40 мл 5X малеатного раствора.

- Буфер для гибридизации: буфер готовился в 50 мл и содержал 10 мл блокирующего раствора, 12,5 мл 20X SSC буфера, 100 мкл - 10% додецилсульфата натрия, 500 мкл - 10% лаурсаркозила, 25 мл формамида.

Мембрана переносилась в стеклянные кюветы для гибридизационной печи – Hybridization shaking oven OH-800D. К мембране добавлялся гибридизационный раствор объемом 30 мл и проводилась прегибридизация в течение 1 ч при 68⁰С. Далее, раствор удалялся и к мембране добавлялось 40 мл гибридизационного раствора, содержащего 30 мкл приготовленной РНК - пробы и 20 мкл РНК пробы для субгеномных РНК цитрусового тристеа вируса. Проба для ЦТВ была предоставлена лабораторией имени Толковского, Волкани центр, Израиль. Инкубацию с пробами проводили в течение 16 ч при температуре 68⁰С. После инкубирования, гибридизационный буфер с пробами удалялся в пробирку для последующего использования и замораживался при - 20⁰С. Мембрана промывалась дважды по 20 мин 2X SSC буфером, который содержал 0,1% додецилсульфата натрия. Далее мембрана промывалась дважды по 20 мин 0,1X SSC буфером, содержащим 0,1% додецилсульфата натрия. Далее, мембрана промывалась дважды по 1 мин 1X малеатным раствором, содержащим 0,01% Tween 20, после чего промывалась дважды по 1 мин 1X малеатным раствором.

После промывания, к мембране добавлялся блокирующий буфер в объеме 50 мл и проводили инкубирование в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее в блокирующий буфер добавлялись 4 мкл антител для

дигоксигенина. Инкубирование с антителами проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее промывали мембрану дважды по 10 мин 1X малеатным раствором, содержащим 0,01% Tween 20, после чего проводили промывание мембраны дважды по 10 мин 1X малеатным раствором.

Приготовление буфера для субстрата, хемилюминесцентная детекция. Буфер для CSPD субстрата готовился в 50 мл и содержал 0.1 М Трис, 0.1 М NaCl, pH раствора доводился до 9.5. Мембрана дважды промывалась в 23 мл буфера для субстрата в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее мембрана переносилась полиэтиленовый файл, закрытый с трех сторон. 7 мкл CSPD субстрата добавлялись в 1 мл буфера для субстрата. Далее мембрану с субстратом инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Далее проводили экспозицию на фотоматериал (пленку) (Carestream® Kodak® BioMax® light film). На мембрану накладывалась пленка и экспозицию проводили в течение 30 мин, при необходимости время экспозиции увеличивали. Далее проводили проявление пленки в течение 1 мин в Developing solution и фиксацию в течение 1 мин в Fixer solution, набор реагентов для проявления и фиксации – Kodak Fixer (Sigma-Aldrich). Пленку анализировали денситометрией при использовании программы Image Studio Lite 5.2 program (LI-COR).

Анализ экспрессии капсидного белка ВАВ, капсидного белка ВХПЛЯ и уЗФБ был осуществлен с помощью Вестерн блоттинга. Белки выделялись из тех же листьев, что и РНК. Белки были выделены методом, основанном на использовании мочевины. Иммуноблоттинг был выполнен при использовании первичных антител к капсидному белку ВХПЯ (Bioreba), первичных антител к ЗФБ (Invitrogen) и первичных антитела к КБ ВАВ (Bioreba), полученных в кроликах. Антитела к иммуноглобулину G кролика (Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase (Sigma- Aldrich)) были использованы как вторичные антитела.

Кроме того, анализ экспрессии уЗФБ в листьях осуществлялся с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии на микроскопе Leica TCS SP8 (Leica MICROSYSTEMS) и с помощью флуоресцентной микроскопии на микроскопе EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific). Для конфокальной микроскопии вырезался эксплант листа размером 1 см², который располагался на предметном стекле и накрывался покровным стеклом. Эксплант смачивался водой, путем добавления нескольких капель пипеткой. Далее проводили микроскопирование. Для флуоресцентной микроскопии на микроскопе EVOS FL Cell Imaging System, использовался целый лист, который анализировался на наличие экспрессии уЗФБ. Лист располагался на чашке Петри. Далее проводили микроскопирование.

Статистическая обработка данных проводилась путем высчитывания Байесовского фактора (minBF) в программе Matlab [351].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Филогенетический анализ Вируса А винограда

Изучение генетического родства позволяет проследить эволюцию вирусов, выявлять консервативные и высокомутабельные регионы геномов. Генетический анализ вирусов, кандидатов для разработки вирусных векторов, позволяет отбирать промоторы из других изолятов для дупликации в геноме вирусного вектора с сохранением стабильности вектора, выявлять подходящие регионы для модификации генома. Филогенетический анализ ВАВ был проведен с целью выявления генетического родства 12 изолятов ВАВ, известных в генетической базе данных NCBI. Изолят РА-3 (Италия), который был использован для разработки вирусных векторов, ранее не изучался на предмет генетического родства с известными изолятами базы данных NCBI. Из известных 11 изолятов, 8 изолятов были выделены из южной Африки, 1 изолят из Бразилии, 1 изолят из Канады и 1 изолят из Италии. Данные изоляты ВАВ способны вызывать 4 типа симптомов синдрома образования желобков у ствола Kober: 1, умеренное обесцвечивание жилок; 2, обесцвечивание жилок и хлороз; 3, обесцвечивание жилок, хлороз, скручивание верхних листьев растения; 4, обширный некроз. По филогенетическому анализу нуклеотидных последовательностей всего генома, изоляты ВАВ подразделяются на 3 группы (рисунок 5), 2-ю группу формируют изоляты обладающие высокой патогенностью и вызывающие сильные поражения. Для филогенетического анализа использовались аминокислотные последовательности 4 вирусных белков, РНК-зависимая РНК – полимеразы, белок передвижения, капсидный белок и Р10. По результатам филогенетического анализа репликазы, РА-3 изолят распределился в группу I совместно с изолятами из Италии (Is 151), Бразилии (TRAJ2- BR) и ЮА (GTG11-2), рисунок 21.

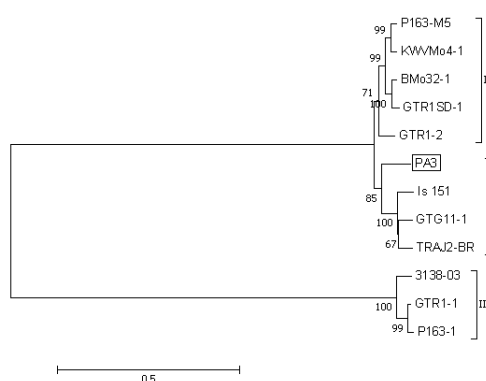


Рисунок 21 – Дендрограмма показывает генетическое расстояние между изолятами ВАВ при анализе РНК-зависимой РНК-полимеразы

РНК - зависимая РНК полимеразы, так же как и капсидный белок, подвержены негативному эволюционному прессу, так как данные белки выполняют важные функции в жизнедеятельности вируса. Данная

закономерность была выявлена ранее Куниным А.С. и Дольжа для РНК-содержащих вирусов.

Следовательно для выявления генетического родства внутри вида перспективнее всего выбирать данные белки. Генетический анализ капсидного белка показал, что штамм РА-3 распределяется в ту же группу I как и в случае репликазы. Изолят РА-3 формирует монофолетическую группу совместно с изолятами из Италии (Is 151), Бразилии (TRAJ2- BR) и ЮА (GTG11-2), рисунок 22.

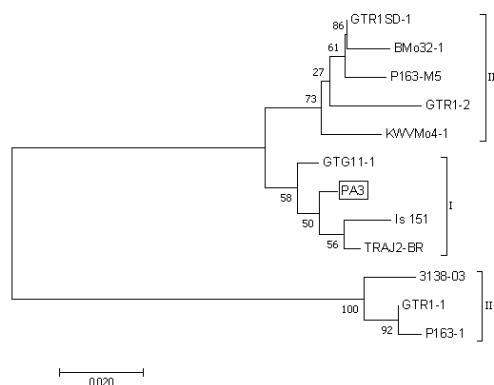


Рисунок 22 - Дендрограмма показывает генетическое расстояние между изолятами ВАР при анализе капсидного белка

Наиболее варибельным участком капсидного белка при анализе 12 изолятов ВАР является N- концевая часть, 1- 36 аминокислоту, а также центральная часть с 80 по 87 аминокислоту, рисунок 23.



Рисунок 23 – Изображение варибельности аминокислотных последовательностей капсидного белка известных изолятов ВАР

Варибельность отмечена в 19% аминокислотных позиций. Позиция 10 и 189 отмечаются равномерным распределением аминокислоты изолейцина - метионина и аланина – серина соответственно, среди 12 изолятов ВАР. РА-3 в положении 10 содержит изолейцин, а в положении 189 серин. Единственная

позиция, в которой отмечается 4 вариантных аминокислот, является позиция 23. В положении 23 у РА-3 находится треонин. Среди вариантных аминокислот находятся: треонин, глутаминовая кислота, глутамин и аланин. Капсидный белок для ВАВ играет важную роль, как в локальном, так и в системном распространении, значимые мутации приведут к полному ограничиванию движения вируса по растению.

При филогенетическом анализе аминокислотных последовательностей белка передвижения, изолят РА-3 распределился отдельно, с наименьшим генетическим расстоянием относительно группы III, рисунок 24.

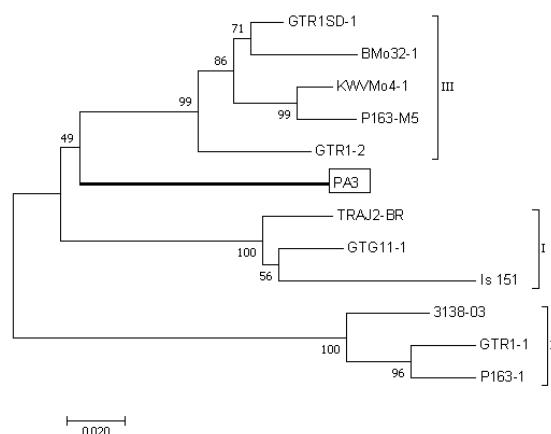


Рисунок 24 – Дендрограмма показывает генетическое расстояние между изолятами ВАВ при анализе белка передвижения

Как было описано ранее, распределение изолятов внутри вида вирусов осуществляется по анализу капсидного белка и РНК- зависимой РНК-полимеразы. Тем не менее, белок передвижения играет также важную роль в распространении вируса по растению. Он способствует прохождению через плазмодесмы путем увеличения просвета. При анализе генетического расстояния между изолятами группы III и изолята РА-3 выявлено, что РА-3 и P163-M5 являются наиболее генетически отдаленными изолятами. РА-3 и GTR1SD-1 являются изолятами, которые содержат наименьшее генетическое расстояние между собой, таблица 7.

Таблица 7 – Генетическое расстояние между изолятами в группе III и изолята РА-3

	РА3	GTR1-2	GTR1SD-1	BMo32-1	KWVMo4-1	P163-M5
РА3						
GTR1-2	0,172					
GTR1SD-1	0,147	0,071				
BMo32-1	0,177	0,094	0,048			
KWVMo4-1	0,172	0,086	0,048	0,075		
P163-M5	0,190	0,086	0,059	0,090	0,033	

В аминокислотных последовательностях белка передвижения 12 изолятов ВАВ, было выявлено 37,4 % вариабельных позиций. Наиболее вариабельными являются участки с 2-19, 125-129, 254-278 аминокислоты, рисунок 25.

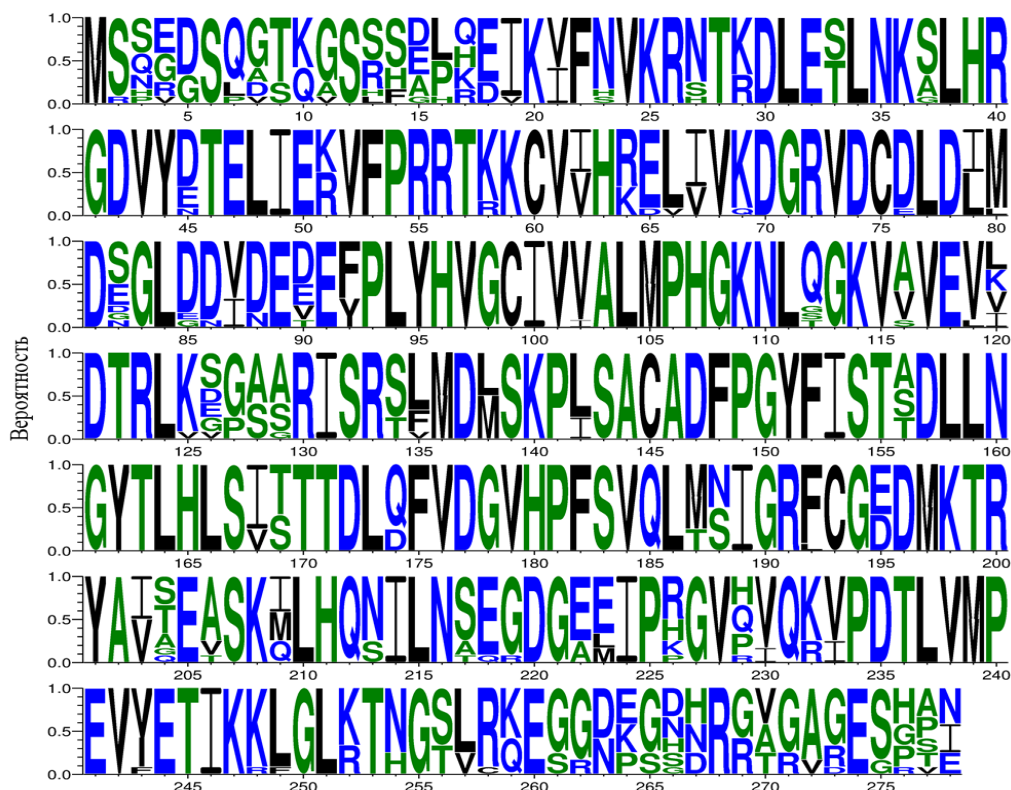


Рисунок 25 - Изображение вариабельности аминокислотных последовательностей белка передвижения известных изолятов ВАВ

Филогенетический анализ при использовании аминокислотных последовательностей белка P10 показал, что изолят РА-3 распределяется в группу I, рисунок 26.

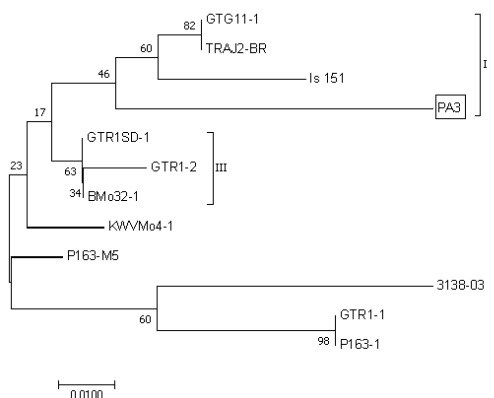


Рисунок 26 - Дендрограмма показывает генетическое расстояние между изолятами ВАВ при анализе аминокислотных последовательностей белка P10

Группа I и II содержат аналогичные изоляты, как и при анализе аминокислотных последовательностей РНК-зависимой РНК полимеразы, капсидного белка, белка передвижения. Изоляты KWVMo4 и P163-M5 группы III распределились отдельно. При этом генетическое родство P163-M5 изолята наибольшее относительно изолятов группы II. При анализе аминокислотной последовательности белка P10 отмечено 17 переменных позиций, рисунок 27.

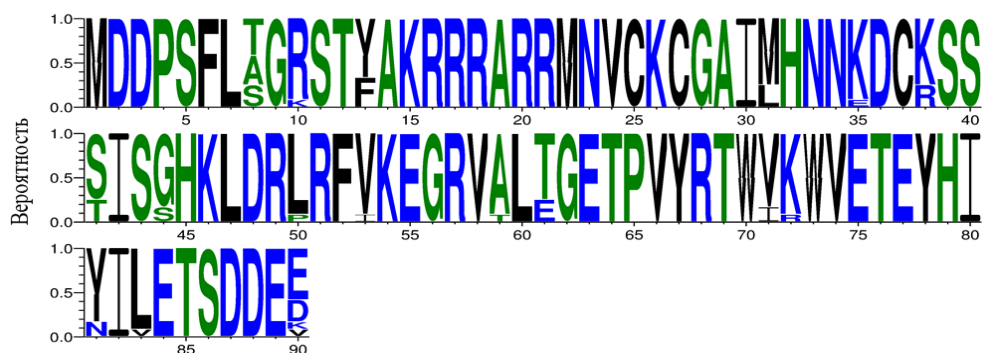


Рисунок 27 - Изображение вариативности аминокислотных последовательностей белка P10 известных изолятов ВАВ

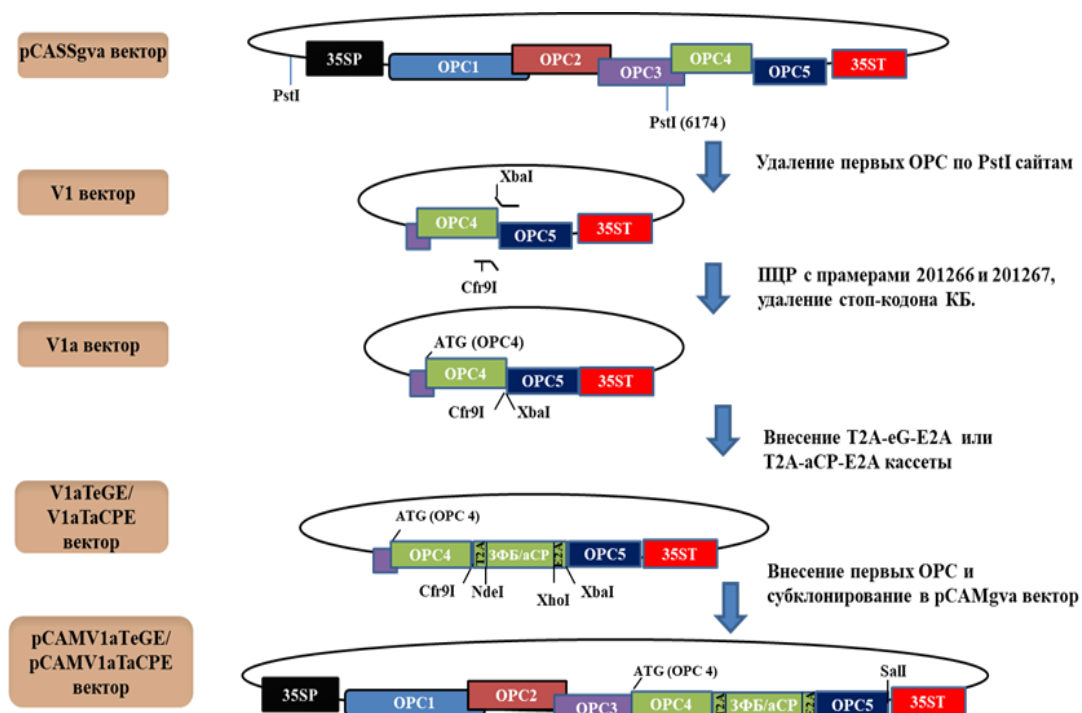
Позиции 8 и 90 отличаются высокой вариативностью. Для позиции 8 возможны три разные аминокислоты: аланин, треонин, серин. В позиции 90 отмечается 4 разные аминокислоты: глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лизин и тирозин.

Генетический анализ показал, что изолят РА-3 располагается в I группу совместно с изолятами из ЮА, Бразилии и Италии. В данной группе находятся изоляты средней патогенности, которые не вызывают сильных поражений растений. Преимуществом изолятов со средней или низкой патогенностью для разработки вирусных векторов является возможность накопления в больших количествах рекомбинантного белка из-за отсутствия некротических повреждений.

3.2 Разработка вирусного вектора на основе полного генома ВАВ

Вирусные вектора на основе полных геномов различных вирусов растений относятся к векторам первого поколения и были использованы одними из первых в транзientной экспрессии гетерологичных белков в растениях. С помощью векторов первого поколения была изучена возможность модификации вирусных геномов без влияния на жизнедеятельность самого вируса. Успешные вирусные вектора были разработаны на основе полных геномов вируса табачной мозаики, X вируса картофеля, вируса мозаики коровьего гороха. Данные вектора позволили экспрессировать в растениях антитела, антигены, пептидные гормоны. На основе генома ВАВ, ранее был разработан вирусный вектор с внесением гетерологичного гена под контроль субгеномного промотора OPC2, но данный вектор обладал низкой экспрессионной активностью. В данной работе был разработан вектор на

основе полного генома ВАВ путем внесения гетерологичного гена под контроль субгеномного промотора ОРС4. Стратегия разработки вектора изображена на рисунке 28. Гетерологичный ген располагался между ОРС4 и ОРС5 [337, р.1035]. Стоп-кодоны капсидного белка ВАВ и целевого белка были удалены. Гетерологичными генами являлись ген усиленного флуоресцентного белка и ген капсидного белка вируса хлоротической пятнистости листьев яблони.



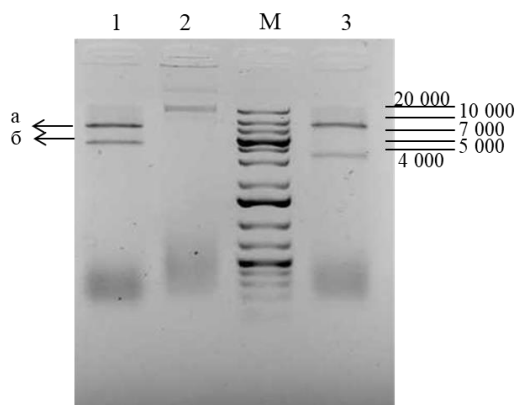
ОРС1 кодирует полипептид (194 кДа), который содержит консервативные мотивы белков ассоциированных с репликацией генома; ОРС2 кодирует белок неизвестной функции и строения; ОРС3 кодирует белок передвижения вируса по растению; ОРС4 кодирует капсидный белок; ОРС5 кодирует супрессор РНК - интерференции

Рисунок 28 – Стратегия разработки вирусного вектора на основе полного генома ВАВ

Каждый из вышеуказанных генов вносился по отдельности в вектор. Гетерологичный ген находился под контролем субгеномного промотора капсидного белка ВАВ и был в рамке считывания с капсидным белком ВАВ и Р10. Экспрессия гетерологичного белка происходила через 3'-терминальную субгеномную РНК, соответствующую капсидному белку ВАВ в немодифицированном геноме. Разделение гетерологичного белка и вирусных белков осуществлялось с помощью 2А пептидов, внесенных между капсидным белком ВАВ и гетерологичным белком, а также между гетерологичным белком и Р10 вируса А винограда.

3.2.1 Удаление первых ОРС и внесение рестрикционных сайтов между ОРС4 и ОРС5

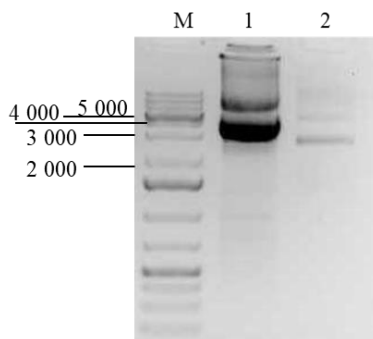
Расщепление вектора pCASSgva по сайтам *PstI* приводит к удалению первых трех ОРС. Один *PstI* расположен в положении 6174 п.о относительно генома ВАВ, на 3'-конце ОРС3. Второй *PstI* сайт расположен перед 35S промотором, рисунок 18. Результаты расщепления pCASSgva вектора изображены на рисунке 29. Фрагмент ДНК, содержащий вектор pCASS и остаток генома ВАВ в дальнейшем был самолигирован и наименован как V1 вектор.



1 - вектор pCASSgva после расщепления эндонуклеазой *PstI*; 2 - вектор pCASSgva не подвергшийся расщеплению; 3 - вектор pCASSgva, расщепление эндонуклеазой *EcoRI*; а - полоса соответствует размеру первых трех ОРС генома ВАВ; б - полоса соответствует размеру вектора pCASS с четвертой и пятой ОРС; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 29 – Расщепление вектора pCASSgva эндонуклеазой *PstI*

Для удаления стоп-кодона КБ ВАВ и внесения сайтов рестрикции между ОРС4 и ОРС5 для клонирования гетерологичных генов, полученный вектор был использован в сайт - направленном ПЦР - мутагенезе, рисунок 30.



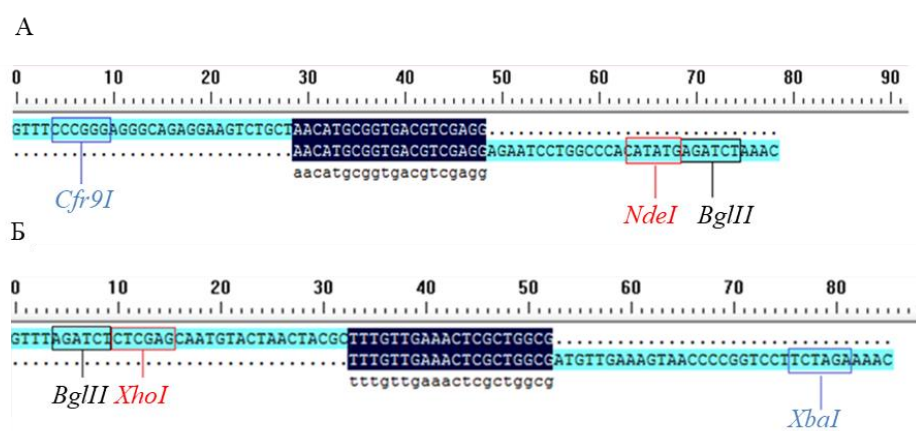
1 – продукты амплификации вектора V1 праймерами 201267 и 201268; 2 – контроль, pCASSgva; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 30 – Амплификация вектора V1

После амплификации, вектор очищался и подвергался самолигированию с получением вектора V1a, который содержал *Cfr9I* и *XbaI* сайты между OPC4 и OPC5.

3.2.2 Клонирование и субклонирование 2А последовательностей и гетерологичного гена между ними

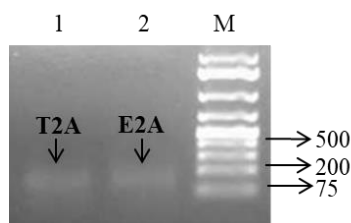
С помощью эквималярной ПЦР были получены Т2А и Е2А последовательности. Праймера для 2А последовательностей перекрывались на 3'-концах, а 5'-концы достраивались с помощью *Taq*-полимеразы, рисунок 31. На своих 5'-концах Т2А и Е2А последовательности несут сайты рестрикции для клонирования в вектор V1a, на 3'-концах располагаются сайты рестрикции для клонирования гетерологичного гена.



А- Праймера для синтеза Т2А пептида; Б- праймера для синтеза Е2А пептида

Рисунок 31 – Схематическое изображение перекрывающихся праймеров для синтеза последовательностей 2А пептидов

Результаты эквималярной ПЦР изображены на рисунке 32. Последовательности 2А пептидов элюировались из геля и клонировались в промежуточные векторы для секвенирования.



1- синтез Т2А; 2- синтез Е2А; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 32 – Результаты гель-электрофореза эквималярной ПЦР для последовательностей 2А пептидов

Последовательность каждого 2А пептида была клонирована в Т-рGEM3zf+ вектор методом Т/А. Расщепление по *Eam1105I* сайтам Т-рGEM3zf+ вектора приводило к образованию неспаренных дезокситимидинов на 3'-концах, что давало возможность прямого клонирования ПЦР - продуктов.

Т-рGEM3zf+ вектор был разработан в три этапа: удаление сайта *Eam1105I* из гена, кодирующего β - лактамазу, плазмиды рGEM3zf+ (получение плазмиды m-рGEM 3zf(+)) (рисунок 33); внесение двух сайтов *Eam1105I* в область множественного клонирования плазмиды m-рGEM 3zf(+); внесение спейсера между сайтами *Eam1105I* [340, с. 5, 341, с. 47]. Для разработанного Т- вектора была подана заявка на патент (приложение Ж).

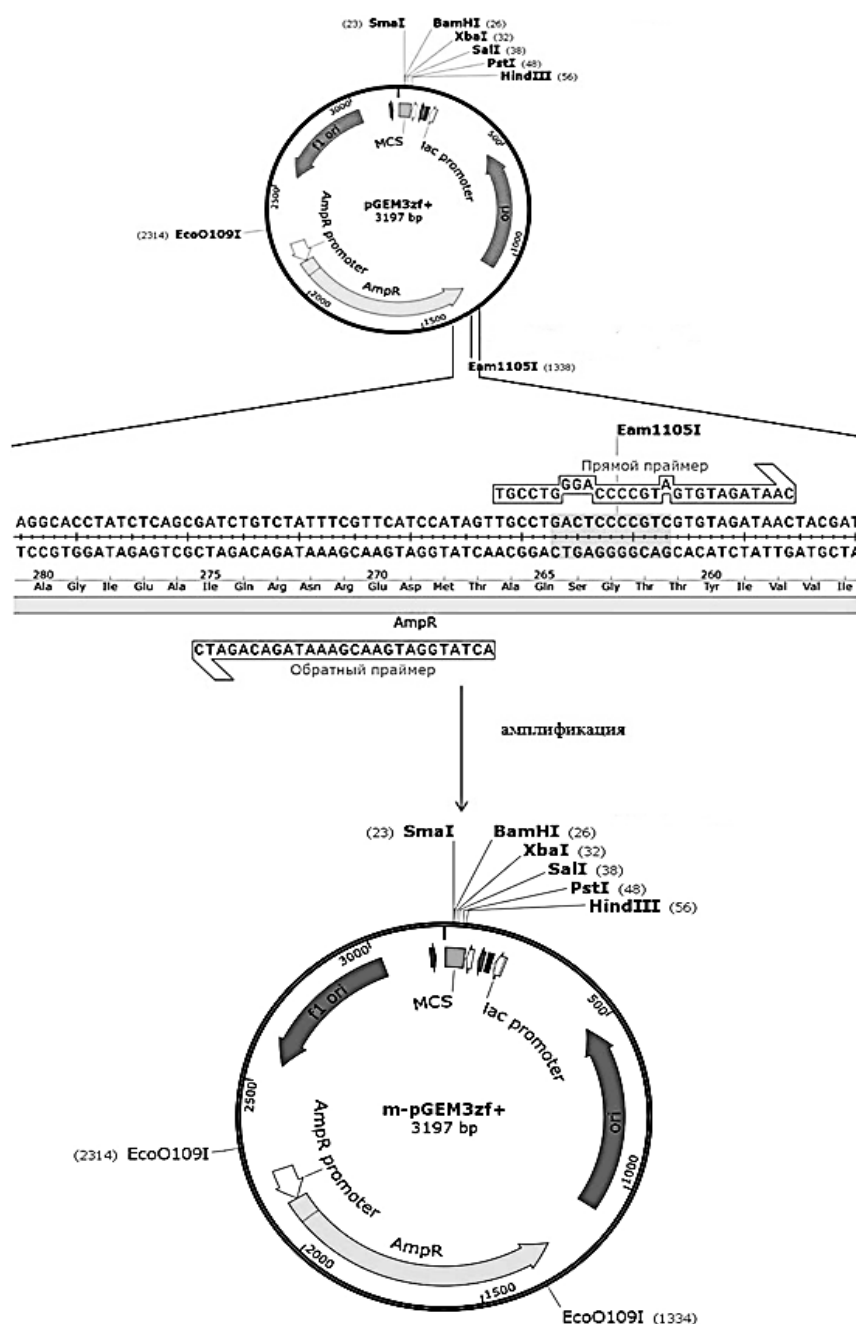


Рисунок 33 - Иллюстрация получения m-рGEM3zf+ вектора

Удаление *Eam1105I* сайта осуществлялось с помощью сайт - направленного ПЦР-мутагенеза со специфичными праймерами рЕ-ф и рЕ-г.

Дезоксицитозин в положении 783 был заменен на дезоксиаденин, дезокситимидин в положении 790 на дезоксиаденин. Дезоксицитозин в положении 791, дезоксиаденин в положении 792 были заменены на дезоксигуанины.

После удаления сайта *Eam1105I* из гена β - лактамазы, аминокислотная последовательность фермента сохранена прежней. Полученная плазмида m-pGEM 3zf(+) была секвенирована на предмет изменения сайта *Eam1105I*. Далее, проводили внесение двух сайтов *Eam1105I* в сайт множественного клонирования. Внесенная олигонуклеотидная последовательность в 39 п.о. с *Eam1105I* сайтами была анализирована секвенированием с использованием T7-праймера, рисунок 34.

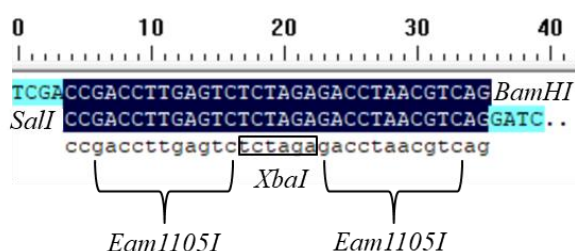
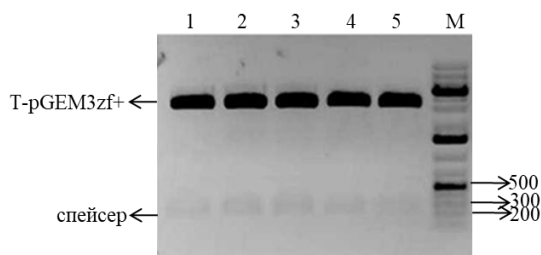


Рисунок 34 – Олигонуклеотидная последовательность, несущая *Eam1105I* сайты

Между *Eam1105I* сайтами был внесен спейсер размером 282 п.о. [342, р. 8], данный спейсер позволял повышать эффективность расщепления по сайтам *Eam1105I* и визуализировать результат расщепления. Анализ внесения спейсера между *Eam1105I* сайтами проводился расщеплением по сайтам *XbaI*, рисунок 35.



1-5 клоны Т-вектора со спейсером между *XbaI* сайтами; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 35 – Расщепление Т-вектора *XbaI* эндонуклеазой

Схема полученного Т-вектора, содержащего спейсер между сайтами *Eam1105I*, приведена на рисунке 36. Полученный вектор может быть

использован в прямом клонировании ПЦР - продуктов без дополнительных их модификаций, *in vitro* транскрипции с помощью T7 или SP6 РНК-полимераз для приготовления специфичных проб или для целей *in vitro* трансляции, прямом севкенировании [342, p. 8].

После расщепления отобранного клона Т-вектора по сайтам *Eam1105I*, линеаризованный вектор с неспаренными дезокситимидинами на 3'-концах элюировался из геля и использовался для клонирования последовательностей 2А пептидов и гетерологичных генов. Последовательности Т2А и Е2А пептидов клонировались в Т-вектор по отдельности.

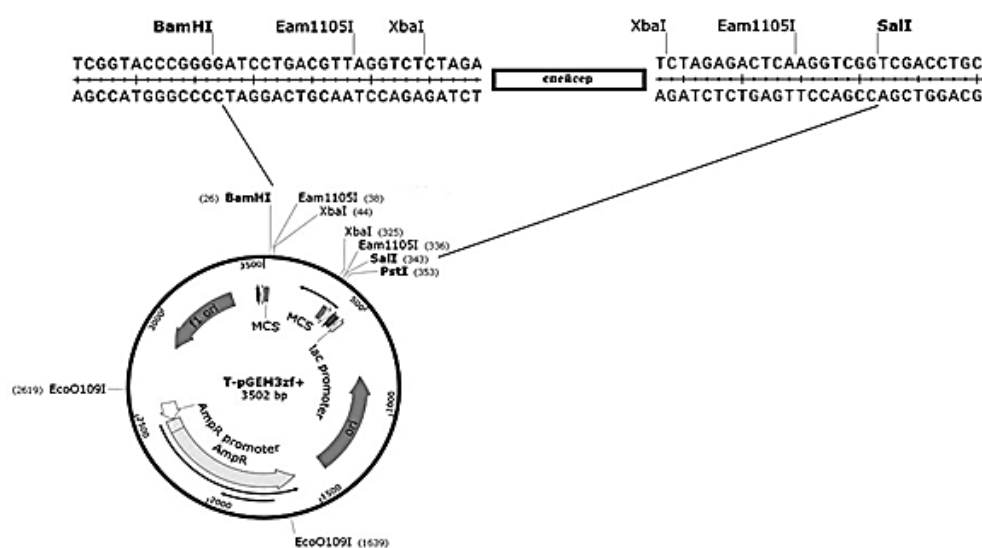
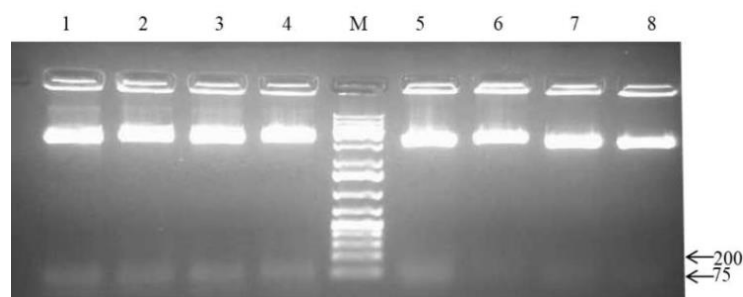


Рисунок 36 – Иллюстрация вектора Т-pGEM3zf+

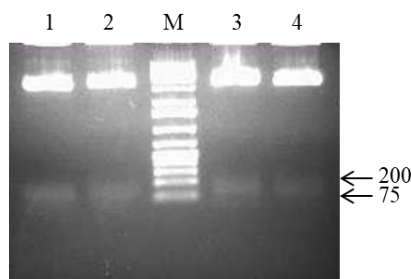
Полученные рекомбинантные плазмиды при клонировании последовательностей 2А пептидов в Т-pGEM3zf+ анализировались с помощью расщепления по сайтам *Cfr9I* и *BglII* для последовательности Т2А, для анализа клонирования Е2А последовательности использовались сайты *BglII* и *XbaI*, рисунок 37.



1-4- клонирование Е2А в Т-pGEM3zf (расщепление эндонуклеазами *Cfr9I* и *BglII*); 5-8- клонирование Т2А в Т-pGEM3zf+ вектор, (расщепление эндонуклеазами *XbaI* и *BglII*); М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 37 - Расщепление рекомбинантного Т-pGEM3zf+ вектора

Полученный рекомбинантный вектор pGemE2A (Т-pGEM3zf+, несущий E2A последовательность) был использован для субклонирования E2A в вектор pGemT2A (Т-pGEM3zf+, несущий T2A последовательность) [338, с. 145]. В результате был получен вектор V4T2E2, несущий T2A и E2A последовательности, рисунок 38. Данный вектор был секвенирован и использован для клонирования гетерологичных генов.

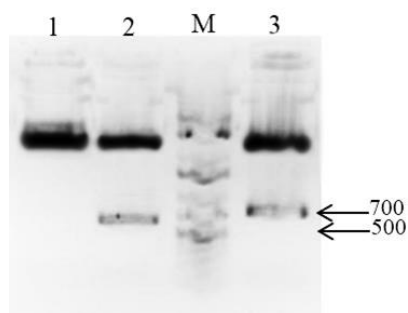


1-4 – разные клоны V4T2E2 вектора; M - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 38 – Расщепления вектора V4T2E2 по сайтам рестрикции *Cfr9I* и *XbaI*

Гетерологичные гены, ген ЗФБ (711 п.о) и КБ ВХПЛЯ (650 п.о), были получены путем амплификации с помощью *Pfu* - полимеразы [343, р. 6, 344, р. 25]. Нуклеотидная последовательность КБ ВХПЛЯ была загружена в генетический банк NCBI, номер доступа - MK086027.

Далее, гетерологичные гены были клонированы в вектор V4T2E2 по сайтам рестрикции *NdeI* и *XhoI*. Отобранные клоны проверялись на наличие целевых генов методом расщепления. Результаты расщепления вектора V4T2gfpE2 (V4T2E2 вектор, несущий ген уЗФБ) и вектора V4T2aCPE2 (V4T2E2 вектор, несущий ген КБ ВХПЛЯ) по сайтам *NdeI* и *XhoI* изображены на рисунке 39.



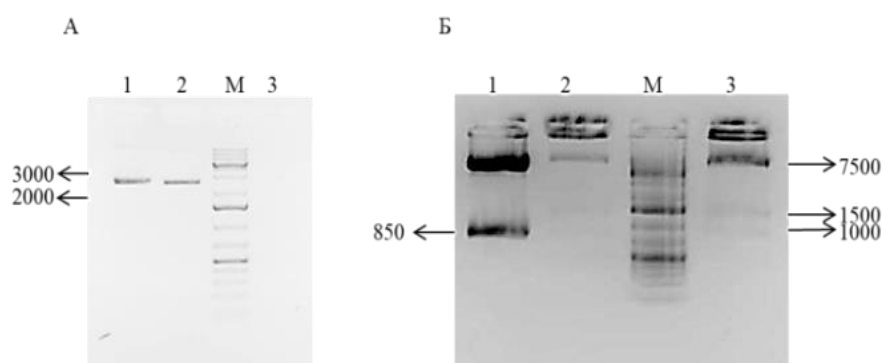
1- контроль рестрикции, pGEM3zf+; 2- расщепленный вектор V4T2aCPE2; 3- расщепленный вектор V4T2gfpE2; M - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 39 – Расщепление V4T2gfpE2 и V4T2aCPE2 векторов по сайтам рестрикции *NdeI* и *XhoI*

Собранные кассеты в векторах V4T2gfpE2 и V4T2aCPE2 были секвенированы с помощью T7 и M13 праймеров для анализа мутаций в гетерологичных генах и в последовательностях 2А пептидов. Далее, кассеты были перенесены в вектор V1a.

3.2.3 Субклонирование модифицированной части генома ВАВ в промежуточный вектор

Кассета, несущая Т2А - ген уЗФБ - Е2А последовательности, из вектора V4T2gfpE2 была субклонирована в вектор V1a, аналогично кассета, несущая Т2А - ген КБ ВХПЛЯ -Е2А последовательности, из вектора V4T2aCPE2 была субклонирована в V1a вектор. Клонирование осуществлялось по *Cfr9I* и *XbaI* сайтам рестрикции. Проверка внесения кассет осуществлялась путем расщепления полученных векторов V1aTeGE (кассета Т2А - ген уЗФБ - Е2А) и V1aTaCPE (кассета Т2А - ген КБ ВХПЛЯ -Е2А) по сайтам *Cfr9I* и *XbaI*. Отобранные клоны данных векторов проверялись секвенированием, анализу на наличие мутаций подвергались ОРС4, кассета и ОРС5. Далее, проводили сборку полного модифицированного генома ВАВ, путем внесения первых трех ОРС в вектора V1aTeGE и V1aTaCPE. Внесение осуществлялось по сайту *PstI*. Анализ полученных векторов осуществлялся амплификацией с праймерами 201364 и 200710, а также путем расщепления *Cfr9I* и *XbaI* эндонуклеазами, рисунок 40.



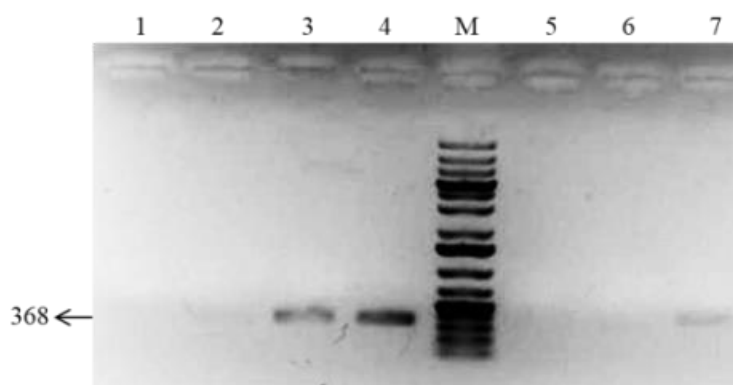
А- амплификация с праймерами 201364 и 200710: 1- положительный клон на наличие первых ОРС с правильной ориентацией в векторе pCASSTEE; 2- положительный клон на наличие первых ОРС с правильной ориентацией в векторе pCASSTaCPE; 3- отрицательный клон на наличие первых ОРС. Б- расщепление по сайтам *Cfr9I* и *XbaI*: 1- отрицательный клон на наличие первых ОРС; 2- положительный клон на наличие первых ОРС с правильной ориентацией в векторе pCASSTEE. 3- положительный клон на наличие первых ОРС с правильной ориентацией в векторе pCASSTaCPE; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 40 - Анализ pCASSTEE и pCASSTaCPE векторов

Полученные pCASSTEE и pCASSTaCPE векторы с правильной ориентацией использовались для субклонирования модифицированной части генома в бинарный вектор pCAMgva.

Создание конструкции pCAMgva

Для получения вектора pCAMgva, немодифицированный геном ВАВ был субклонирован из вектора pCASSgva в плазмиду pCAMBIA2300. Совместно с геномом ВАВ были субклонированы регуляторные регионы, 35S промотор и 35S терминатор, фланкирующие геном. Отобранные клоны pCAMgva вектора анализировались на наличие генома ВАВ с помощью амплификации при использовании праймеров 200709 и 200710 [347, с.74], рисунок 41. В работу был взят клон 4. pCAMgva вектор использовался для трансформации агробактерий и последующей агроинфильтрации растений. Инфекционная способность вируса А винограда, при клонировании его генома в бинарный вектор, была подтверждена системным распространением инфекции по растению [345, р.206, 346, с.199]. pCAMgva вектор служил контролем экспрессии гетерологичных белков в разработанных векторах на основе генома ВАВ.



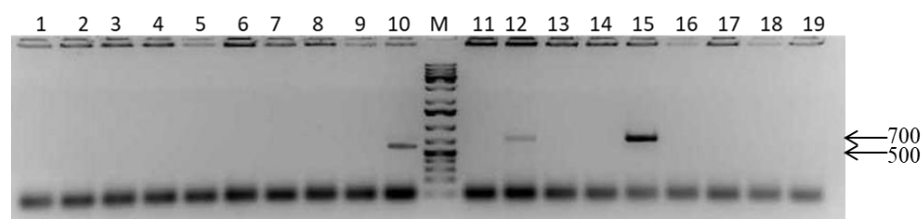
3,4,7 – положительные клоны на наличие генома ВАВ в pCAMBIA2300. 1,2,5,6 – отрицательные клоны на наличие генома ВАВ в pCAMBIA2300; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 41 - Скрининг на наличие генома ВАВ в pCAMBIA2300

Модифицированные геномы ВАВ при разработке вирусных векторов переносились в бинарный вектор для последующей доставки в растения с помощью агробактерий. Для переноса модифицированного генома ВАВ использовался вектор pCAMgva.

3.2.4 Сборка модифицированного генома ВАВ в бинарном векторе

Модифицированная часть генома ВАВ была перенесена в вектор pCAMgva по сайтам *AatII* и *Sall*. Анализ на наличие рекомбинантных векторов проводили с помощью ПЦР, использовались праймеры специфичные для КБ ВХПЛЯ и уЗФБ, рисунок 42. Отобранные клоны вектора pCAMV1aTeGE и вектора pCAMV1aTaCPE были использованы для трансформации агробактерий с последующей агробактериальной инфильтрацией растений.



1-4,6-10- клоны для анализа наличия КБ ВПХЛЯ, в работу отобран клон 10; лунка 12-19 - клоны для анализа наличия уЗФБ, в работу отобран клон 15; 5,11- отрицательные контроли; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 42 - Скрининг на наличие гена ЗФБ/КБ ВХПЛЯ в векторе pCAMgva

Гетерологичные гены в разработанном векторе находились под контролем субгеномного промотора капсидного белка ВАВ и были в одной рамке с КБ ВАВ (ОРС4) и с Р10 (ОРС5). Стоп - кодоны в генах, кодирующих капсидный белок ВАВ и гетерологичный ген, были удалены. Для отсоединения гетерологичных белков от вирусных белков использовались 2А пептиды, Т2А и Е2А [352]. При отсоединении гетерологичного белка от КБ ВАВ, рекомбинантный белок дополнительно на N-конце имел две аминокислоты, пролин и гистидин, рисунок 43. Капсидный белок ВАВ, при этом, имел дополнительные 19 аминокислот на своем С-конце. При разъединении гетерологичного белка и Р10, гетерологичный белок имел на С-конце всю последовательность Е2А, кроме пролина. Как было показано в ряде работ, дополнительные короткие пептиды, не влияют на активность гетерологичного белка.

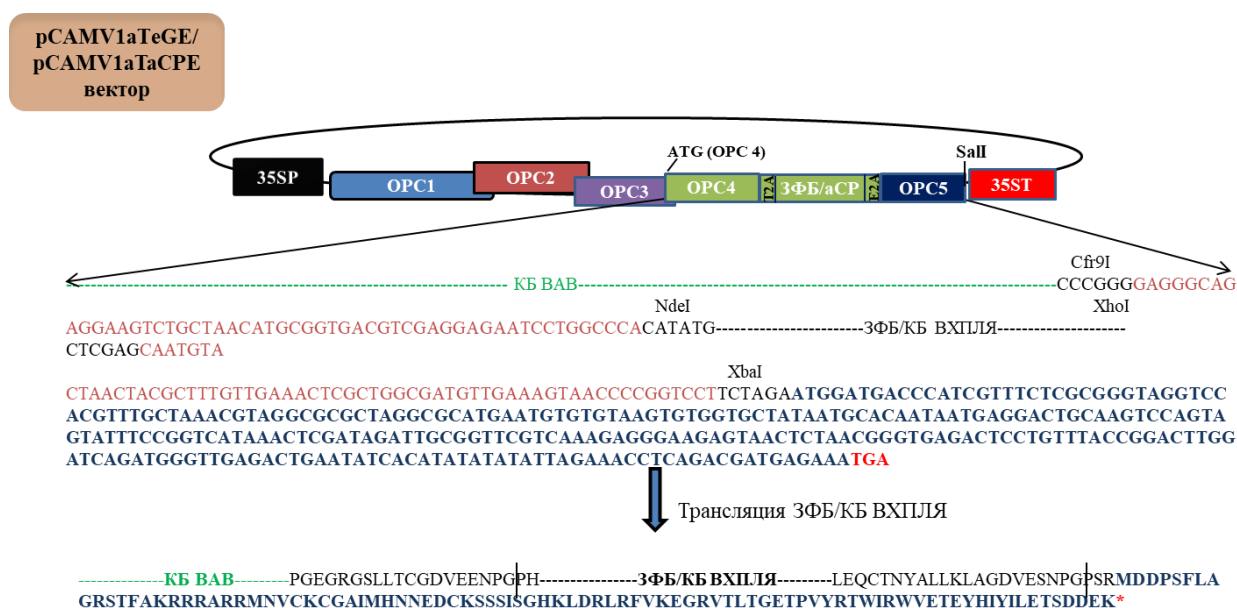
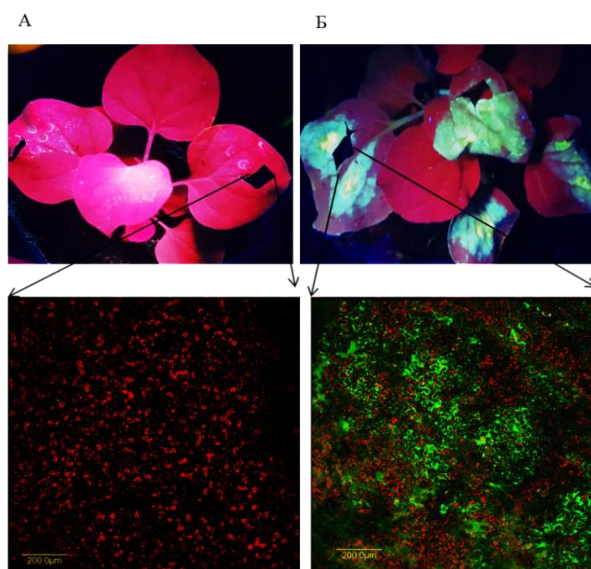


Рисунок 43 – Иллюстрация модифицированной части генома ВАВ в вирусных векторах pCAMV1aTeGE и pCAMV1aTaCPE

В случае необходимости получения чистых рекомбинантных белков, между белком и пептидом вносятся сайты разрезания специфичными протеазами.

3.2.5 Экспрессия гетерологичных белков в векторе на основе полного генома ВАВ

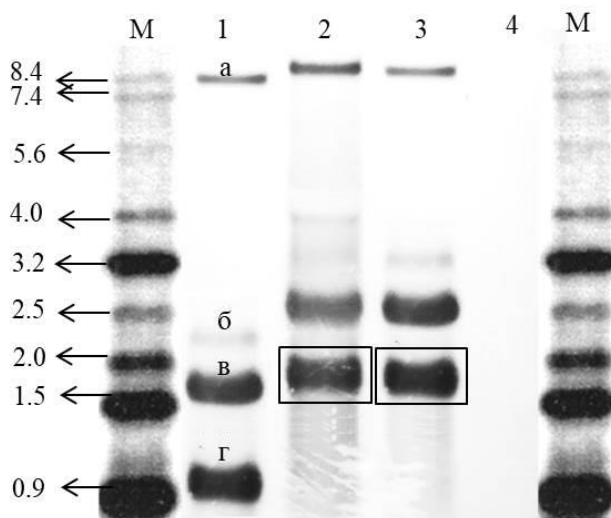
Для анализа экспрессии гетерологичных белков в растениях с помощью вирусного вектора, проводили агроинфильтрацию *Nicotiana benthamiana*. Эффективность вирусных векторов оценивалась на уровне транскрипции субгеномных РНК ВАВ и экспрессии рекомбинантных и вирусных белков. Инфильтрацию проводили полностью всей листовой пластинки, плотность агробактерий составила 0.6 [346, с.199]. Эксперимент повторялся 3 раза. Вектор рСАМgva являлся контролем транскрипции модифицированного вирусного генома, векторы рСАМV1aTeGE и рСАМV1aTaCPE – исследуемые разработанные вирусные вектора, рСАМBIA2300 - отрицательный контроль. На 4-ый день после агроинфильтрации из зараженных листьев выделяли РНК и белки. Выделенную тотальную РНК использовали для проведения Нозерн блоттинга с целью анализа транскрипции субгеномной РНК, специфичной для ОРС4-гетерологичный ген-ОРС5. Выделенные белки исследовались методом иммуноблоттинга для определения эффективности экспрессии гетерологичных белков. Для вектора рСАМV1aTeGE на 4-ый день после инфильтрации, зараженные листья табака дополнительно проверялись микроскопированием. Результаты микроскопирования показали, что уЗФБ успешно экспрессируется в инфильтрованных листьях растений, рисунок 44.



А- инокуляция вектором рСАМgva (отрицательный контроль); Б- инокуляция вирусным вектором рСАМV1aTeGE, несущим eGFP, зараженный лист.

Рисунок 44 – Результаты флуоресцентной конфокальной микроскопии, анализ экспрессии уЗФБ в растениях при использовании вектора на основе полного генома ВАВ, 4-й день

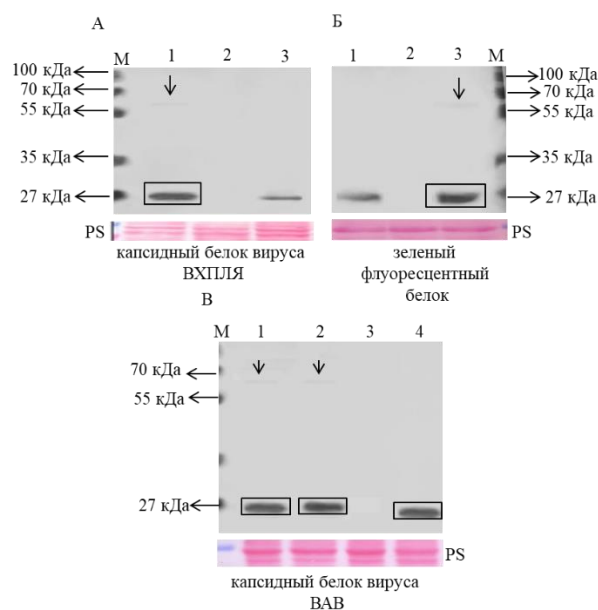
Результаты анализа транскрипции 3'- субгеномных РНК изображены на рисунке 45. Как видно из рисунка 45, транскрипция 3'- субгеномных РНК сохранена. Субгеномная РНК для ОРС4 - гетерологичного гена - ОРС5 транскрибируется для двух векторов рСАНV1аТеGE и рСАНV1аТаСРЕ.



1- тотальная РНК при инфильтрации вектором рСАНMgva, положительный контроль для экспрессии генома ВАВ, (б-г)- 3'- субгеномные РНК ВАВ: а - геномная РНК размером 7.4 кб, б - субгеномная РНК размером 2.2 кб, в - субгеномная РНК размером 1.8 кб, г - субгеномная РНК размером 1.0 кб; полосы 2 и 3 - тотальная РНК выделена на 4-ый день после агроинфилтрации из зараженных листьев: 2- Тотальная РНК выделенная из растений при агроинфилтрации вектором рСАНV1аТеGE, несущим ген уЗФБ, прямоугольником выделена субгеномная РНК кодирующая ОРС4 - ген уЗФБ - ОРС5; 3- тотальная РНК выделенная при инокуляции вектором рСАНV1аТаСРЕ, прямоугольником выделена субгеномная РНК кодирующая ОРС4 - ген КБ ВХПЛЯ - ОРС5; 4 - тотальная РНК при агроинфилтрации вектором рСАНMeG, отрицательный контроль для экспрессии генома ВАВ; М - маркер, 3'- субгеномные РНК вируса ЦТВ (цитрусовый тристеа вирус)

Рисунок 45 - Гибридизация вирусной РНК со специфичной пробой для ОРС5 негативной полярности

После выделения РНК и анализа транскрипции субгеномных РНК, из тех же листьев были выделены белки и анализированы антителами к гетерологичным белкам. Результаты иммуноблоттинга показывают, что экспрессия гетерологичных белков осуществляется в разделенной форме, гетерологичные белки успешно отсоединяются от белков ВАВ [337, p.1038, 353, 354, 355], но также присутствует неразделенная форма белка в малых количествах рисунок 46. Изучение эффективности экспрессии гетерологичных белков осуществлялось с помощью денситометрического анализа [357]. Помимо анализа экспрессии гетерологичных белков, экспрессия КБ ВАВ в разработанных векторах аналогично анализировалась с помощью первичных антител, использовались те же образцы белков, что и для анализа гетерологичных белков.



А - иммуноблоттинг с первичными антителами к белку KB ВХПЛЯ: 1- агроинфильтрация вектором pSAMV1aTaCPE; 2- отрицательный контроль, инфильтрация вектором pSAMgva; 3- положительный контроль, вектор pSAMaCP. Б - иммуноблоттинг с первичными антителами к уЗФБ: 1- агроинфильтрация вектором pSAMeG, положительный контроль; 2- отрицательный контроль, вектор pSAMgva; 3- агроинфильтрация вектором pSAMV1aTeGE. В - иммуноблоттинг с первичными антителами к капсидному белку ВAB: 1- агроинфильтрация вектором pSAMV1aTaCPE; 2 - агроинфильтрация вектором pSAMV1aTeGE; 3- отрицательный контроль, инфильтрация вектором pSAMaCP; 4 - агроинфильтрация вектором pSAMgva, положительный контроль. Стрелка, направленная вниз указывает на неразделенную форму белка. Прямоугольником выделена разделённая форма гетерологичного и KB ВAB белков. PS - Ponceau S окрашивание для относительного анализа количества белка в образце

Рисунок 46 - Изображение результатов экспрессии гетерологичных белков в растениях на 4-ый день после агроинфильтрации

Условия проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле и иммуноблоттинга были одинаковыми, как для гетерологичных белков, так и для KB ВAB. Уровень экспрессии гетерологичных белков относительно KB ВAB высчитывался с помощью компьютерной программы Image Studio Lite 5.2 program (LI-COR) для денситометрического анализа. Уровень экспрессии гетерологичных белков сравнивался с уровнем экспрессии KB ВAB, который был экспрессирован в разработанном векторе, а также с уровнем KB ВAB, который был получен при заражении вирусом с немодифицированным геномом, рисунок 47. Результаты денситометрического анализа показывают, что уровень экспрессии гетерологичных белков соответствует уровню экспрессии KB ВAB в вирусе с диким типом генома, что говорит об эффективности разработанного вектора. Эффективность экспрессии гетерологичных белков не снижена, внесение как уЗФБ гена, так и гена KB ВХПЛЯ не приводят к качественным или количественным изменениям экспрессии модифицированной части генома ВAB.

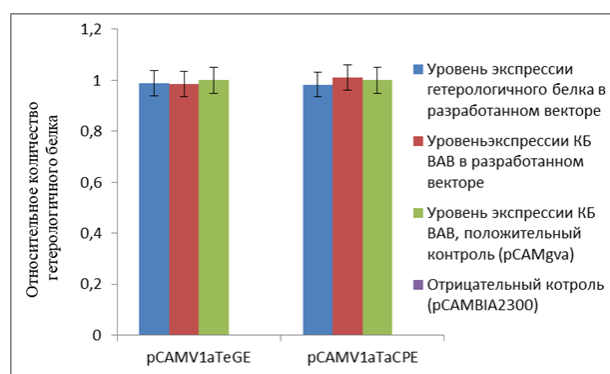
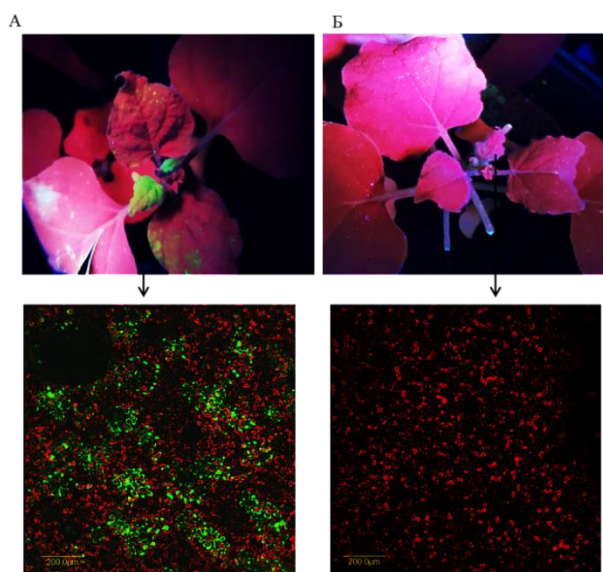


Рисунок 47 - Результаты сравнения экспрессии гетерологичных белков относительно модифицированного и немодифицированного КБ ВАВ, ($\min BF < 0,03$, $n=3$)

Кроме того, нами было подтверждено передвижение вируса по растению при агроинфильтрации разработанным вектором. На 10-ый день после агроинфильтрации проводилась флуоресцентная конфокальная микроскопия системных листьев для вектора pCAMV1aTeGE, рисунок 48.



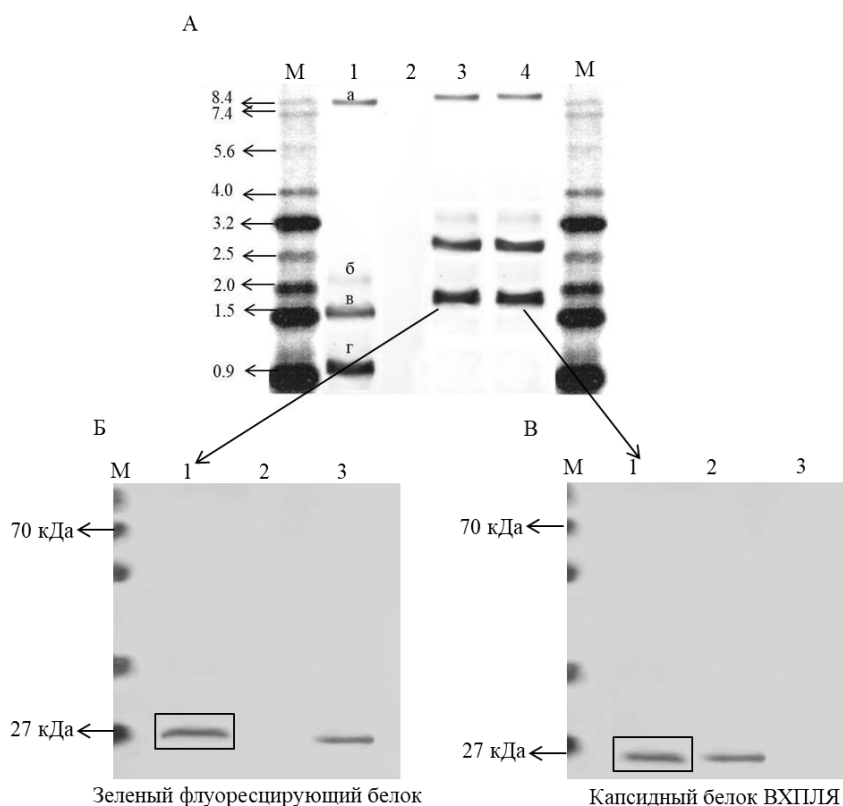
А- инокуляция вирусным вектором pCAMV1aTeGE, несущим eGFP, системный лист;
Б- инокуляция вектором pCAMgva (отрицательный контроль).

Рисунок 48 – Результаты флуоресцентной конфокальной микроскопии для анализа экспрессии уЗФБ в системных листьях растения при использовании вирусного вектора на основе полного генома ВАВ, 10-ый день

В верхних незараженных листьях была отмечена экспрессия уЗФБ, что говорит о передвижении вируса по растению, так как вирус ВАВ передвигается исключительно в упакованном виде.

Также, проводилось исследование наличия субгеномных вирусных РНК и гетерологичных белков методами гибридизации со специфичной пробой и

иммуноблоттингом соответственно, рисунок 49. Транскрипция субгеномной РНК, соответствующей ОРС4, гетерологичному гену и ОРС5 в системных листьях на 10-ый день после агроинфильтрации была подтверждена для векторов рСАМV1аTeGE и рСАМV1аTaCPЕ.



А - гибридизация со специфичной пробой к ОРС5: 1- тотальная РНК при инфильтрации вектором рСАМgva, положительный контроль для экспрессии генома ВАВ, (б-г)- 3'- субгеномные РНК ВАВ: а - геномная РНК размером 7.4 кб, б - субгеномная РНК размером 2.2 кб, в - субгеномная РНК размером 1.8 кб, г - субгеномная РНК размером 1.0 кб; полосы 3 и 4 - тотальная РНК выделена на 7-ой день после агроинфильтрации из системных листьев: 2 - Тотальная РНК выделенная из растений при агроинфильтрации вектором рСАМV1аTeGE, несущим ген ЗФБ, от субгеномной РНК кодирующей ОРС4 - ген ЗФБ - ОРС5 идет стрелка к белку ЗФБ; 3 - тотальная РНК при агроинфильтрации вектором рСАМеG, отрицательный контроль для экспрессии генома ВАВ; 4 - тотальная РНК выделенная при инокуляции вектором рСАМV1аTaCPЕ, от субгеномной РНК кодирующая ОРС4 - ген КБ ВХПЛЯ - ОРС5 идет стрелка к КБ ВХПЛЯ; М - маркер, 3'- субгеномные РНК вируса ЦТВ (цитрусовый тристеа вирус). Б и В - иммуноблоттинг с первичными антителами к рекомбинантным белкам. Б - иммуноблоттинг с первичными антителами к ЗФБ: 1- агроинфильтрация вектором рСАМV1аTeGE; 2- отрицательный контроль, вектор рСАМgva; 3 - агроинфильтрация вектором рСАМеG, положительный контроль. В - иммуноблоттинг с первичными антителами к капсидному белку ВХПЛЯ: 1- агроинфильтрация вектором рСАМV1аTaCPЕ; 2- агроинфильтрация вектором рСАМаCP; 3 - отрицательный контроль, инфильтрация вектором рСАМgva. Прямоугольником выделена разделённая форма гетерологичных белков

Рисунок 49 - Изображение результатов экспрессии гетерологичных белков в системных листьях растений на 10-ый день после агроинфильтрации

Наличие дополнительных 19 аминокислот на С-конце КБ ВАВ не влияют на упаковку, локальный и системный транспорт вируса. Разработанный вектор на основе полного генома ВАВ может успешно использоваться для экспрессии гетерологичных белков в растениях методом комплексной технологии, а именно путем заражения всего растения.

3.3 Разработка вектора путем деконструирования генома ВАВ. Замена OPC4 на гетерологичный ген.

В настоящий момент, вектора с деконструированным геномом используются для получения коммерческих белков в растениях и являются наиболее эффективными векторами для производства рекомбинантных белков в «зеленых биофабриках». Вирусный вектор на основе генома ВАВ для экспрессии гетерологичных белков в растениях был разработан путем замены OPC4 ВАВ на гетерологичный ген, рисунок 50.

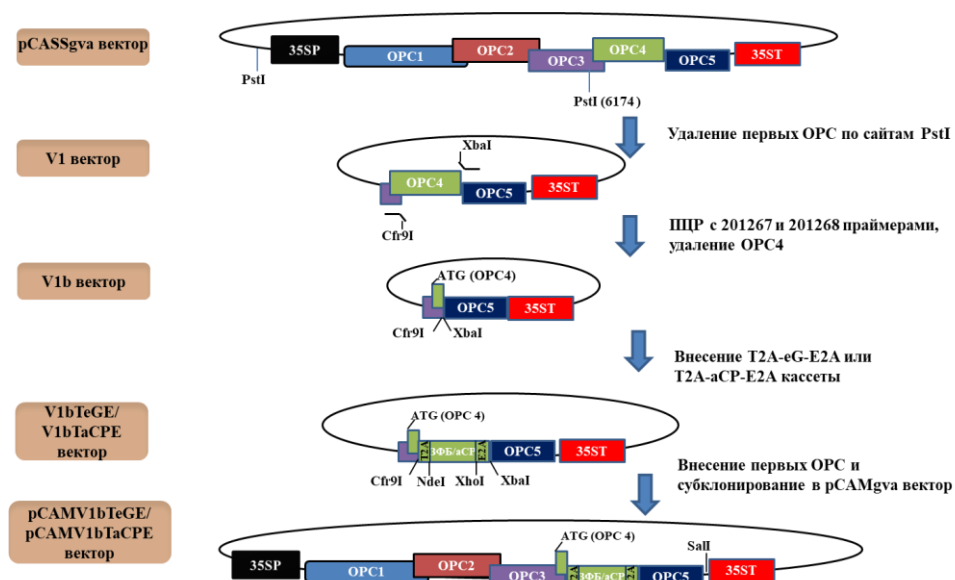
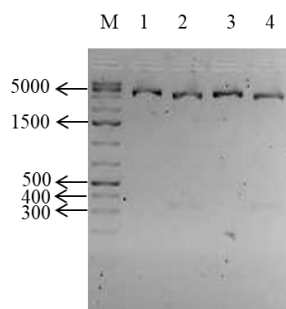


Рисунок 50 - Стратегия разработки вирусного вектора путем деконструирования генома ВАВ, замена OPC4 на гетерологичный ген

Гетерологичный ген располагался под контролем субгеномного промотора КБ ВАВ и был в одной рамке считывания с белком Р10. Область перекрытия OPC3 и OPC4 сохранялась интактной и находилась в рамке с гетерологичным геном. Для котрансляционного отделения гетерологичного белка от белков ВАВ, были внесены 2А последовательности. Т2А - последовательность была внесена между гетерологичным геном и последовательностью области перекрытия OPC3 и OPC4. Е2А - последовательность была внесена между гетерологичным геном и OPC5. Для повышения эффективности экспрессии гетерологичных белков, были разработаны трансгенные растения *Nicotiana benthamiana*, несущие ген капсидного белка ВАВ [358].

3.3.1 Удаление OPC4 из генома ВАВ

Для удаления OPC4, кодирующего капсидный белок, из генома ВАВ, был использован метод ПЦР - мутагенеза. Удаление осуществлялось из вектора V1 и происходило ниже области перекрытия OPC3 с OPC4 и с внесением сайтов рестрикции *Cfr9I*, *BglII* и *XbaI*. После удаления OPC4 из вектора V1, был получен вектор V1b. Для анализа полученного V1b вектора было проведено расщепление по сайтам *PstI* и *BglII*, рисунок 51.



1 и 3- клоны отрицательные на наличие рестрикционных сайтов между OPC3 и OPC5; 2 и 4- клоны положительные на наличие рестрикционных сайтов между OPC3 и OPC5; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 51 – Расщепление вектора V1b по сайтам рестрикции *PstI* и *BglII*.

Для работы был отобран клон 2, в котором удалена OPC4 и внесены рестрикционные сайты. Проверка модифицированной области в векторе V1b осуществлялась методом секвенирования. На рисунке 52 отображена область модификации в векторе V1b.

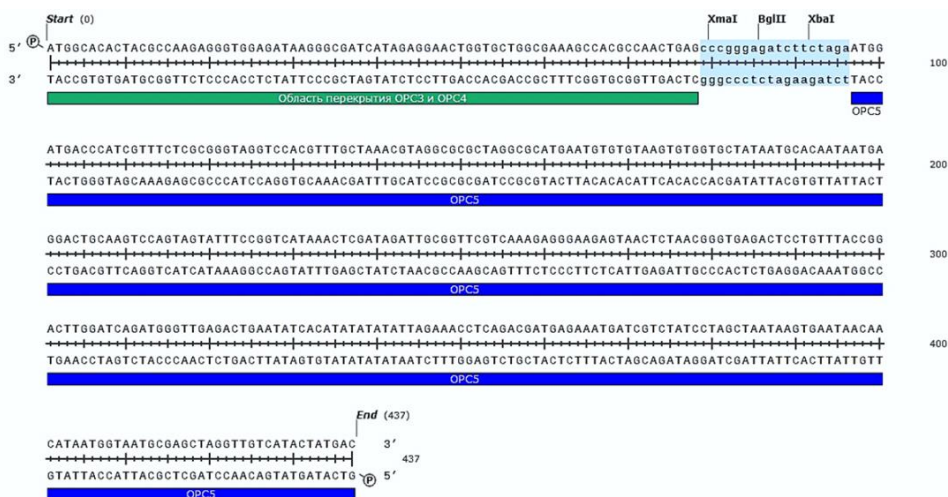


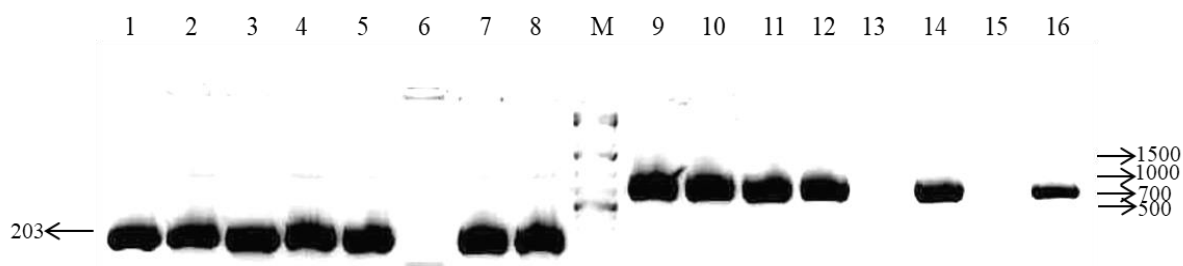
Рисунок 52 – Изображение модифицированной области генома ВАВ в векторе V1b

Голубым цветом выделена область внесенных сайтов ресрикции после ПЦР-мутагенеза

Стоп - кодон ОРС3 сохранен. Белок передвижения, кодируемый ОРС3, экспрессируется в нативной форме. Для экспрессии гетерологичного гена используется субгеномный промотор ОРС4, который расположен в 3'-концевой части ОРС3. Так как субгеномной РНК для ОРС5 не обнаружено, но имеется стоп-кодон между ОРС4 и ОРС5, предполагается что промотор для ОРС5 находится в ОРС4 (приложение В), удаление ОРС4 приводит к выключению экспрессии Р10. Для экспрессии Р10, ОРС5 расположена в одной рамке с гетерологичным белком и областью перекрытия.

3.3.2 Субклонирование кассеты, несущей последовательности 2А пептидов и гетерологичного гена

Т2А - ген уЗФБ - Е2А кассета, из вектора V4T2gfpE2 была субклонирована в вектор V1b, аналогично кассета, несущая Т2А - ген КБ ВХПЛЯ -Е2А последовательности, из вектора V4T2aCPE2 была субклонирована в V1b вектор. Кассеты предварительно были собраны в векторе V4T2gfpE2 (V4T2E2 вектор, несущий ген уЗФБ) и в векторе V4T2aCPE2 (V4T2E2 вектор, несущий ген КБ ВХПЛЯ), гетерологичные гены в данных векторах располагались между 2А последовательностями. Клонирование осуществлялось по *Cfr9I* и *XbaI* сайтам рестрикции. У полученных клонов, анализ наличия кассет осуществлялся с помощью ПЦР при использовании специфичных праймеров для гена уЗФБ (eGFP-f и eGFP-r) и для гена КБ ВХПЛЯ (aCPdet-f и aCPdet-r), рисунок 53. Отобранные клоны векторов были маркированы как V1bTeGE и V1bTaCPE. Анализ модифицированной части генома в V1bTeGE и V1bTaCPE проводился секвенированием, проверялось наличие мутаций в последовательностях ОРС3, 2А пептидах, гетерологичных генах, ОРС5. Клоны, в которых не было обнаружено мутаций, использовались для сборки полного модифицированного генома ВАВ путем внесения первых ОРС.



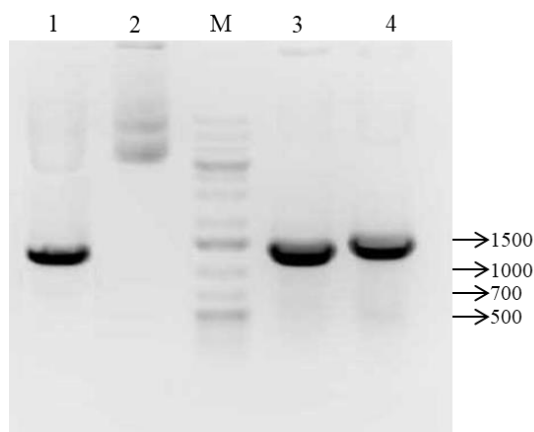
1-5; 7-8 – клоны, анализируемые на наличие Т2А - ген КБ ВХПЛЯ - Е2А последовательности; лунка 6, 13- отрицательные контроли; 9-12, 14-16- клоны, анализируемые на наличие Т2А - ген уЗФБ -Е2А последовательности; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 53 - Скрининг на наличие кассет в V1b векторе

Для сборки полного модифицированного генома ВАВ отобрали клон 3 для вектора V1bTeGE и клон 11 для вектора V1bTaCPE.

3.3.3 Сборка модифицированной части генома в промежуточном векторе

В вектор V1bTeGE, клон 3, и в вектор V1bTaCPE, клон 11, была субклонирована последовательность, кодирующая первые ОРС, из pCASSgva. Субклонирование было осуществлено по сайту рестрикции *PstI*. Ввиду того, что клонирование осуществляется по одному рестрикционному сайту, возможно появление клонов с неправильной ориентацией относительно модифицированной части генома. Анализ клонов на наличие правильной ориентации осуществлялся с помощью ПЦР, рисунок 54.



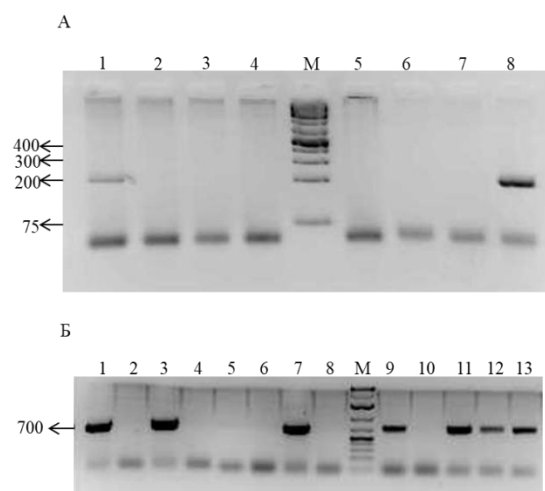
1 – положительный контроль, pCASSgva; лунка 2 - отрицательный контроль, pCASS; 3 - pCASSv1bTEE, гетерологичный ген – уЗФБ; 4 - pCASSv1bTaCPE, гетерологичный ген – КБ ВХПЛЯ; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 54 - Результаты ПЦР - анализа векторов pCASSv1bTEE и pCASSv1bTaCPE на наличие правильной ориентации первых ОРС

Праймеры для ПЦР, 201364 и 200710, фланкируют *PstI* сайт. Отобранные клоны с правильной ориентацией севкенировались для анализа мутаций в области модификации генома ВАВ. Кроме того, был проведен анализ вирусных векторов на наличие мутаций рестрикционных сайтов в области ОРС1 и ОРС3 путем расщепления по сайтам *AatII*, *AvrII*, *EcoRI*.

3.3.4 Сборка модифицированного генома в бинарном векторе

Модифицированная часть генома ВАВ из двух векторов pCASSv1bTEE и pCASSv1bTaCPE была перенесена в вектор pCAMgva по сайтам *AatII* и *Sall*. Анализ на наличие рекомбинантных векторов проводили путем амплификации с использованием aCPdet-f и aCPdet-r праймеров для КБ ВХПЛЯ и eGFP-f и eGFP-r праймеров для уЗФБ, рисунок 55. В результате клонирования были получены векторы pCAMV1bTeGE и pCAMV1bTaCPE. Для вектора pCAMV1bTeGE был отобран клон 1, для вектора pCAMV1bTaCPE отобрали клон 8.



А - скрининг на наличие КБ ВХПЛЯ: 1-6,8 - клоны при субклонировании из вектора pCASSv1bTaCPE, 1 и 8 клоны несут модифицированную часть генома ВАВ в pCAMgva, 7 - отрицательный контроль; Б - скрининг на наличие уЗФБ: 1, 3-13 - клоны при субклонировании модифицированной части генома из pCASSv1bTEE вектора, 1,3,7,9,11-13 - клоны несут модифицированную часть генома ВАВ в pCAMgva, 2 - отрицательный контроль; М - маркер GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, размеры соответствуют п.о.

Рисунок 55 - Результаты скрининга рекомбинантного вектора pCAMgva

Гетерологичные гены в разработанном векторе находились под контролем субгеномного промотора КБ ВАВ и были в одной рамке с P10 и с аминокислотной последовательностью области перекрытия OPC3 и OPC4. Для разделения гетерологичных белков и белков ВАВ использовались 2А пептиды. При отсоединении гетерологичного белка от аминокислотной последовательности области перекрытия OPC3 и OPC4, рекомбинантный белок дополнительно на N-конце имел две аминокислоты, пролин и гистидин, рисунок 56.

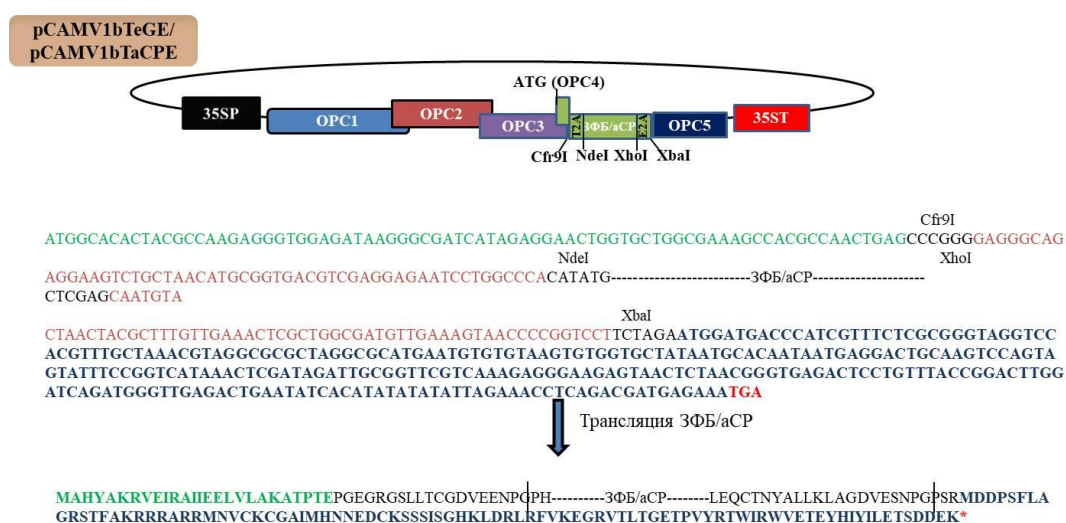


Рисунок 56 – Иллюстрация модифицированной части генома ВАВ в вирусных векторах pCAMV1bTeGE и pCAMV1bTaCPE

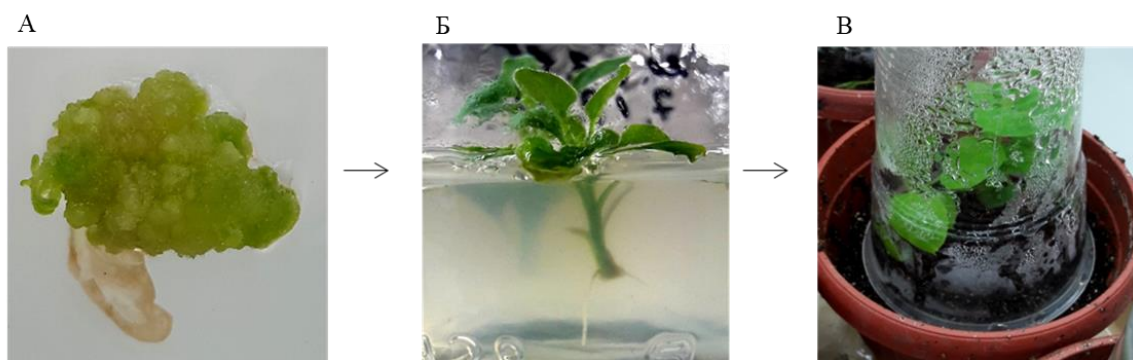
На своем С-конце при разъединении гетерологичного белка и Р10, гетерологичный белок имел всю последовательность Е2А, кроме пролина. Р10 белок имел дополнительные пролин, серин и аргинин аминокислоты на своем N - конце.

Разработка деконструированных векторов подразумевает восстановление удаленных вирусных генов в транс-системах, ввиду чего были разработаны трансгенные растения, несущие ген капсидного белка ВАВ. Эффективность разработанного вектора была анализирована при инфильтрации трансгенных и нетрансгенных растений.

3.3.5 Создание трансгенных растений, несущих ген капсидного белка вируса А винограда

Трансгенные растения *Nicotiana benthamiana*, несущие ген КБ ВАВ, в данной работе были разработаны с целью изучения экспрессии гетерологичных белков в вирусном векторе с заменой ОРС4 на гетерологичный ген (деконструированный вектор) [349, с.320]. Так как вирус А винограда не способен передвигаться в неупакованном в капсид виде, восстановление данной функции за счет трансгенных растений позволит вирусу передвигаться как локально, так и системно, и соответственно в большем количестве накапливаться в клетках растений. Деконструированные вектора подразумевают восстановление утраченных генов вирусов через разработку трансгенных растений или путем переноса генов на транс-вектора. Разработанные трансгенные растения, несущие КБ ВАВ, позволили установить, что накопление гетерологичного белка в трансгенных растениях намного выше по сравнению с накоплением в нетрансгенных, что связано со способностью вируса передвигаться по растению и физической защитой РНК генома от РНК - интерференции.

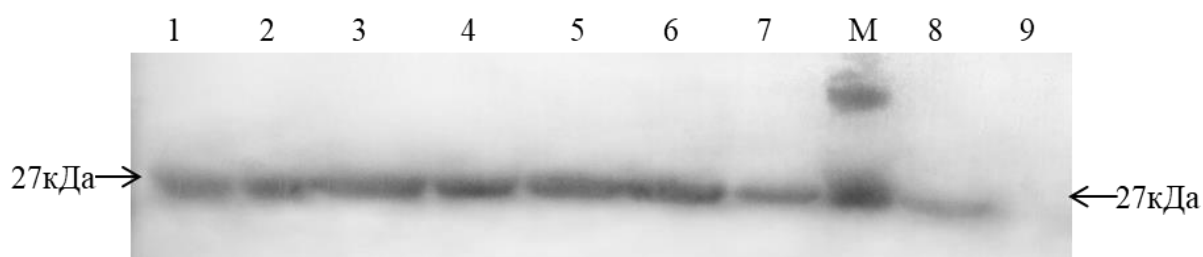
Разработка трансгенных растений была осуществлена с помощью агробактериальной трансформации. Первые попытки получить каллус, после кокультивирования эксплантов с агробактериями, несущими бинарный вектор с геном КБ ВАВ, не удались. Перерост агробактерий наблюдался уже на 2-ой день после кокультивации и постоянное пересаживание эксплантов на свежую питательную среду приводило к обесцвечиванию эксплантов и к их гибели. Проблемы с переростом агробактерий были, прежде всего, связаны с тем, что антибиотик тиментин оказался очень чувствительным к температуре, добавление его в слегка горячую среду приводило к его быстрому разрушению. При этом канамицин оставался активным. Добавление тиминтина в слегка теплую среду позволило сохранить его активность. Каллус сформировался через 5-6 недель после кокультивирования. Для регенерации трансгенных растений использовалось 15 эксплантов. Побеги размером 1-2 см в длину пересаживали на среду для формирования корней. Процесс получения регенерантов отображен на рисунке 57. После появления 2-3 корней, регенерантное растение переносили в почву для адаптации и получения семян Т1 и Т2 поколения.



А - получение каллуса; Б - регенерант; В- адаптация регенеранта в почве

Рисунок 57 – Иллюстрация процесса регенерации трансгенных растений

Перед высадкой регенерантов в почву их проверяли на наличие трансгена методом ПЦР. Хранение семян Т1 и Т2 поколения осуществлялось при 4⁰С в холодильнике. Семена Т1 поколения проверялись на наличие трансгена методом герминации на среде с антибиотиками (канамицин). Совместно с трансгеном, КБ ВАВ, в геном растения было произведено внесение гена устойчивости к канамицину как селективного маркера. Семена гомозиготных растений по трансгену прорастали с формированием полноценного растения Т1 поколения, семена гетерозиготных растений по трансгену прорастали, появлялся побег, который обесцвечивался и погибал. От растений Т1 поколения, при самоопылении, получали семена Т2 поколения. Растения Т2 поколения подвергались агроинфильтрации разработанными деконструктивными векторами. Перед агроинфильтрацией трансгенные растения проверялись серологическими методами, на предмет экспрессии КБ ВАВ, рисунок 58.



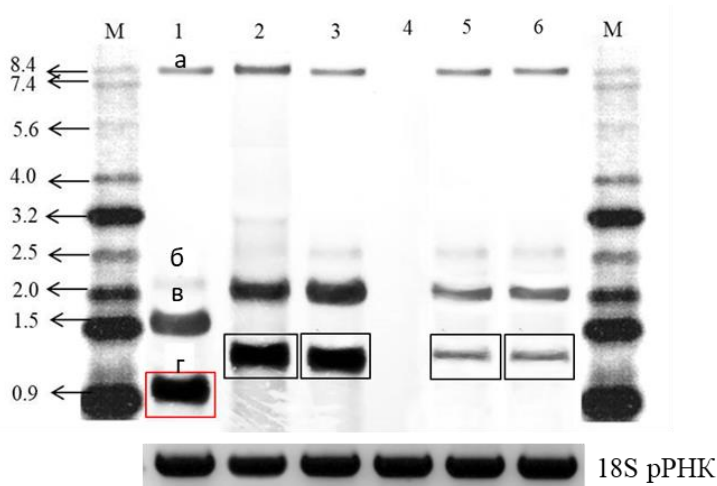
1-8 - положительные растения на наличие КБ ВАВ; 9- отрицательный контроль (нетрансгенное растение)

Рисунок 58 – Результаты экспрессии КБ ВАВ в трансгенных растениях Т2 поколения

Трансгенные растения, в которых происходила экспрессии КБ ВАВ, использовались для агроинфильтрации и анализа экспрессии гетерологичных белков в вирусном векторе с заменой ОРС4.

3.3.6 Экспрессия гетерологичных белков в векторе с деконструированным геномом

Для анализа экспрессии гетерологичных белков с помощью полученных вирусных векторов с заменой ОРС4 на ген уЗФБ или ген КБ ВХПЛЯ была произведена агроинфильтрация растений трансгенного и нетрансгенного табака. Инфильтрации подвергались 2 растения и эксперимент был проведен 3 раза для каждого вектора. Агроинфильтрации подвергались листья табака, расположенные напротив друг друга. Площадь инфильтрации маркировалась. На 4-ый день после агроинфильтрации из растений выделялись РНК и белки. Анализ экспрессии гетерологичных белков проводился на уровне транскрипции и трансляции. Транскрипция гетерологичных генов проверялась методом гибридизации с пробой специфичной к ОРС5. Тем самым были проанализированы 3'- субгеномные РНК, в том числе субгеномная РНК, кодирующая гетерологичный ген - ОРС5, рисунок 59.



1- тотальная РНК при инфильтрации вектором рСАМgva, положительный контроль для экспрессии генома ВАВ, (б-г)- 3'- субгеномные РНК ВАВ: а- геномная РНК размером 7.4 кб, б- субгеномная РНК размером 2.2 кб, в- субгеномная РНК размером 1.8 кб, г- субгеномная РНК размером 1.0 кб, красным прямоугольником выделена субгеномная РНК, кодирующая КБ ВАВ в немодифицированном вирусе; 2 - Тотальная РНК выделенная из трансгенных растений при агроинфильтрации вектором рСАМV1bTeGE, несущим ген ЗФБ, прямоугольником выделена субгеномная РНК кодирующая область перекрытия ОРС3 и ОРС4 - ген ЗФБ - ОРС5; 3- тотальная РНК выделенная из трансгенных растений при инокуляции вектором рСАМV1bTaСРЕ, прямоугольником выделена субгеномная РНК кодирующая область перекрытия ОРС3 и ОРС4-ген КБ ВХПЛЯ-ОРС5; 4- тотальная РНК при агроинфильтрации вектором рСАМеG, отрицательный контроль для экспрессии генома ВАВ; 5- Тотальная РНК выделенная из нетрансгенных растений при агроинфильтрации вектором рСАМV1bTeGE; 6- Тотальная РНК выделенная из нетрансгенных растений при агроинфильтрации вектором рСАМV1bTaСРЕ; М - маркер, 3'- субгеномные РНК вируса ЦТВ (цитрусовый тристеза вирус)

Рисунок 59 – Изображение результатов гибридизации вирусной РНК для векторов рСАМV1bTeGE и рСАМV1bTaСРЕ со специфичной пробой негативной полярности для ОРС5

Как видно из рисунка 59, происходит транскрипция 3'- субгеномных РНК вируса при инфильтрации растений как вектором рСAMV1bTeGE так и вектором рСAMV1bTaCPE. Количество субгеномной РНК, кодирующей гетерологичный ген- OPC5, при агроинфильтрации нетрансгенных растений ниже в 7 раз при сравнении с количеством РНК при инфильтрации трансгенных растений, рисунок 60. Количество субгеномной РНК, кодирующей гетерологичный ген - OPC5, как для рСAMV1bTeGE вектора, так и для вектора рСAMV1bTaCPE при заражении трансгенных растений соответствует количеству субгеномной РНК (OPC4-OPC5) дикого типа вируса при заражении нетрансгенных растений.

Измерение уровня транскрипции субгеномных РНК было проведено с помощью денситометрического анализа. Удаление капсидного белка значительно влияет на накопление как геномной, так и субгеномных РНК вируса. Несмотря на наличие супрессора РНК- интерференции (P10), отсутствие капсидного белка приводит к быстрой деградации вирусной РНК и не происходит передвижения вируса по растению. Восстановление экспрессии капсидного белка через трансгенные растения позволит вирусной РНК накапливаться в количестве, которое соответствует количеству накопления вирусной РНК при заражении диким типом вируса.

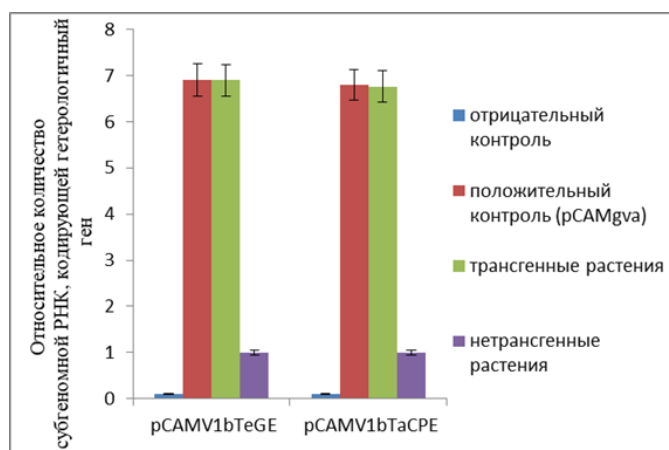
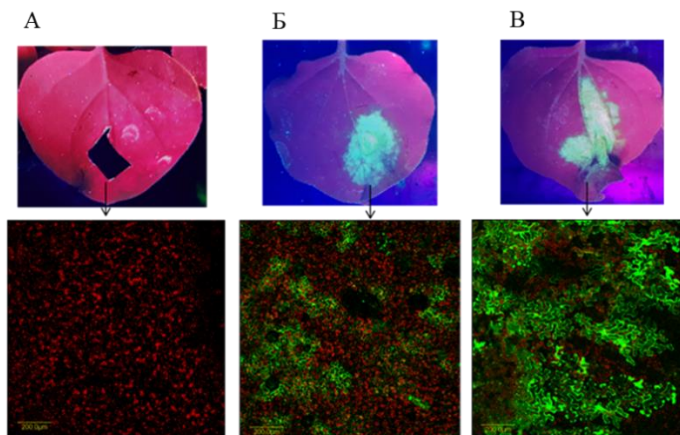


Рисунок 60 – Гистограмма отображает уровень транскрипции целевой субгеномной РНК в вирусном векторе с заменой OPC4 на гетерологичный ген, (minBF <0,03, n=3)

Тем самым, вектор с заменой OPC4 на гетерологичный ген необходимо использовать путем восстановления экспрессии капсидного белка в транс-системах либо путем ко-агроинфильтрации с вирусом дикого типа. Вектора с деконструированным геномом вируса подразумевают восстановление утраченных генов вирусов через разработку трансгенных растений или путем переноса генов на транс-вектора. Преимущество данной системы заключается в возможности внесения протяженных генов в вирусный вектор, а также в накоплении большего количества гетерологичных белков за счет отсутствия конкуренции за энергетические ресурсы.

Анализ экспрессии гетерологичных белков осуществлялся с помощью иммуноблоттинга с использованием первичных антител к целевым белкам. Кроме того, экспрессия уЗФБ в векторе pCAMV1bTeGE анализировалась флуоресцентной конфокальной микроскопией на 4-ый день после агроинфильтрации. Как видно из рисунка 62, экспрессия уЗФБ была подтверждена при инфильтрации как трансгенных, так и нетрансгенных растений.



А- инокуляция вектором pCAMgva; Б- инокуляция нетрансгенных растений вирусным вектором pCAMV1bTeGE, несущим eGFP; В- инокуляция трансгенных растений, несущих КБ BAV, вирусным вектором pCAMV1bTeGE.

Рисунок 61 – Флуоресцентная конфокальная микроскопия для анализа экспрессии уЗФБ в растениях при использовании вирусного вектора с заменой ОРС4, 4-й день

Сравнительный анализ экспрессии ЗФБ в листьях трансгенных и нетрансгенных растений был осуществлен с помощью программы MICA (Multi image analysis). Обрабатывались фотографии с высоким разрешением, полученные на микроскопе Leica TCS SP8, рисунок 62.

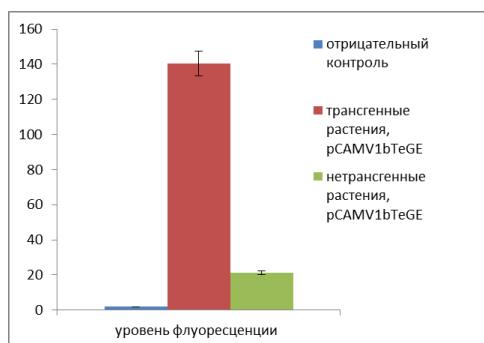
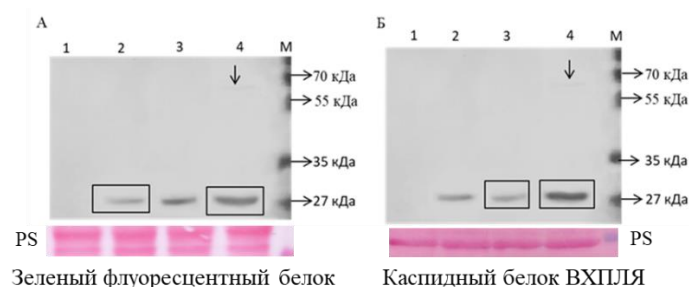


Рисунок 62 - Гистограмма изображает уровень экспрессии уЗФБ в векторе pCAMV1bTeGE, (minBF <0,03, n=3)

Уровень флуоресценции при экспрессии уЗФБ в трансгенных растениях превышал в 7 раз уровень флуоресценции при экспрессии уЗФБ в

нетрансгенных растениях. Соответствующее соотношение было выявлено при измерении количества субгеномной РНК, кодирующей ген уЗФБ-ОРС5. Отсутствие экспрессии капсидного белка ВАВ ограничивает локальное и системное передвижение вируса, и соответственно сказывается на накоплении геномной и субгеномных РНК. Кроме того, капсидный белок выполняет функцию физической защиты генома вируса. С помощью иммуноблоттинга была подтверждена экспрессия гетерологичных белков в разделенном виде от Р10 ВАВ, рисунок 63.



А - иммуноблоттинг с антителами к белку уЗФБ: 1- отрицательный контроль, вектор рСАМgva; 2- вектором рСАМV1bTeGE, нетрансгенные растения; 3- вектор рСАМеG, положительный контроль; 4- вектор рСАМV1bTeGE, трансгенные растения. Б- иммуноблоттинг с антителами к капсидному белку ВХПЛЯ: 1- отрицательный контроль, вектор рСАМgva; 2- положительный контроль, вектор рСАМаСР; 3 - вектор рСАМV1bТаСРЕ, нетрансгенные растения; 4- вектор рСАМV1bТаСРЕ, трансгенные растения. Стрелка, направленная вниз - неразделенная форма белка. Прямоугольник - разделенная форма гетерологичного и КБ ВАВ белков. PS - Ponceau S окрашивание для относительного анализа количества белка в образце

Рисунок 63 - Результаты экспрессии гетерологичных белков в растениях при использовании вектора с заменой ОРС4 на гетерологичный ген, 4-ый день

Уровень экспрессии измерялся с помощью денситометрического анализа и сравнивался с уровнем экспрессии КБ ВАВ дикого типа, рисунок 64.

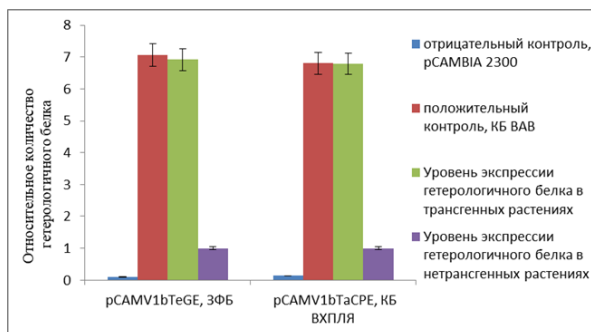
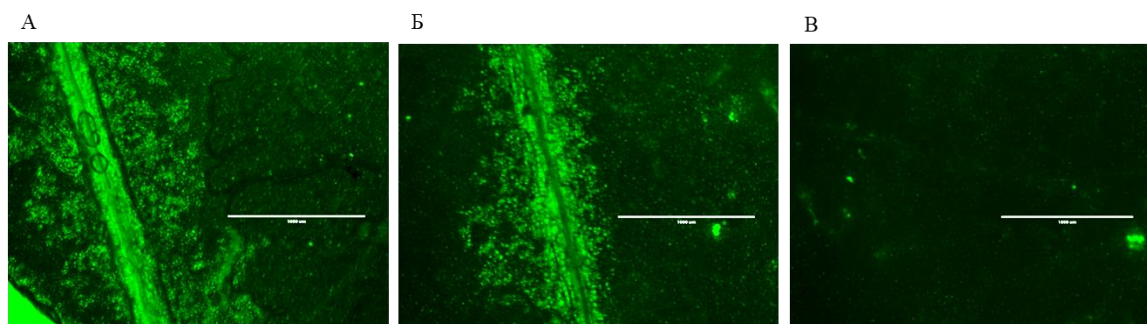


Рисунок 64 – Гистограмма изображает уровень экспрессии гетерологичных белков в разработанном вирусном векторе, (minBF <0,03, n=3)

Для сравнительного анализа экспрессии гетерологичных белков относительно КБ ВАВ, агроинфильтрацию растений, выделение белков и иммуноблоттинг проводили при одинаковых условиях. Как видно из результатов сравнительного анализа, уровень экспрессии гетерологичных белков в трансгенных растениях, несущих КБ ВАВ, соответствует уровню экспрессии КБ дикого типа ВАВ. Сравнение проводилось относительно КБ дикого типа ВАВ ввиду того, что гетерологичный ген расположен под контролем субгеномного промотора ОРС4, также как и КБ дикого типа ВАВ. Уровень экспрессии рекомбинантного белка в нетрансгенных растениях был ниже в 7 раз относительно уровня экспрессии в трансгенных растениях. Следовательно, использование вирусного вектора, разработанного путем деконструирования генома с заменой ОРС4 на гетерологичный ген, возможно при восстановлении экспрессии капсидного белка ВАВ в транс-системах.

Кроме того, было подтверждено восстановление передвижения деконструированного вируса в трансгенных растениях, несущих ген капсидного белка ВАВ, рисунок 65.



А и Б - системные листья трансгенного растения *Nicotiana benthamiana*; В - лист контрольного растения, трансгенное растение зараженное вектором рСАМgva

Рисунок 65 - Флуоресцентная микроскопия системных листьев трансгенных растений для деконструированного вектора

Передвижение как локальное, так и системное было подтверждено для деконструированного вектора, несущего ген уЗФБ. Тем не менее, данный вектор предполагает использование комплексной технологии для получения рекомбинантных белков в растениях, так как данная технология предлагает ряд преимуществ. Главными преимуществами являются: короткое время получения целевых белков, а также повышенное количество белка.

В настоящий момент не известно работ связанных с разработкой вирусных векторов на основе деконструированного генома ВАВ и с внесением гетерологичных генов под контроль субгеномного промотора ОРС4. Нами было показано, что внесенные рекомбинантные гены под контроль субгеномного промотора ОРС4, успешно экспрессируются с сохранением эффективности экспрессии в трансгенных растениях. Преимущество разработанного вектора заключается в возможности внесения протяженных генов без влияния на

стабильность вируса. Кроме того, удаление вирусных генов приводит к накоплению большего количества целевых белков благодаря отсутствию конкуренции за энергетические ресурсы. Для вектора на основе деконструированного генома ВАВ была подана заявка на патент (приложение И). Вирусный вектор может успешно использоваться для экспрессии гетерологичных белков в трансгенных растениях с помощью комплексной технологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка векторов на основе геномов вирусов для экспрессии рекомбинантных белков является актуальной в виду ряда причин. Среди которых наиболее важными являются: получение большого количества целевого белка, гибкость инженерии векторов. Преимущества использования растений для экспрессии рекомбинантных белков с помощью векторов на основе геномов вирусов растений заключаются в возможности получать целевой белок свободный от патогенов животных, наличии необходимых посттрансляционных модификаций белков, дешевизне культивирования растений и возможности быстрого масштабирования производства. Помимо практической значимости, вирусные векторы являются очень важным инструментом для изучения молекулярной биологии взаимодействий патогена и хозяина, функциональной геномики растений. В настоящий момент насчитывается около 1363 видов вирусов растений. Несмотря на большое разнообразие вирусов растений, известные коммерческие вектора разработаны только на основе геномов вируса табачной мозаики, вируса Х картофеля, вируса мозаики люцерны и вируса мозаики коровьего гороха. Помимо РНК-содержащих вирусов, в разработке векторов используются ДНК-содержащие вирусы такие как вирус желтой карликовости фасоли. Разработка векторов на основе геномов разных вирусов растений осуществляется с целью создания универсального стабильного вектора с получением большого количества гетерологичного белка. Эффективность экспрессии рекомбинантных белков в растениях с помощью известных векторов может достигать до 5 г на 1 кг сырой массы листьев растений. В то время как получение целевых белков в трансгенных растениях ограничивается количеством целевого белка в 1 г на 1 кг сырой массы. В инженерии вирусных векторов преобладает две стратегии: первая заключается в разработке векторов на основе полного генома вируса, путем внесения дополнительного гена в вирусный геном, вторая основывается на деконструировании генома вируса путем удаления генов с заменой на гетерологичные, а также с перераспределением генов вируса на разные молекулы.

Ранее, на основе генома вируса А винограда был разработан вектор с внесением гетерологичного гена под контроль субгеномного промотора ORC2. Результаты экспрессии рекомбинантного белка показали, что количество целевого белка слишком низкое и вектор являлся нестабильным из-за дубликации субгеномного промотора ORC2. Замена субгеномного промотора ORC2 на промотор из другого изолята ВАВ привела к сохранению гетерологичного гена в векторе. Разработка вектора на основе генома ВАВ путем внесения гетерологичных генов под контроль субгеномного промотора ORC4 ранее не проводились, несмотря на то, что внесение целевых генов под контроль субгеномных промоторов капсидных белков является наиболее актуальной методикой получения большого количества рекомбинантных белков.

В данной работе впервые было произведено внесение гетерологичных генов под контроль субгеномного промотора капсидного белка ВАВ. В работе было создано два вектора, один вектор был разработан путем внесения дополнительного гена в геном вируса, между ORC4 и ORC5, второй вектор был разработан путем замены ORC4 на гетерологичный ген. Целевой ген находился в одной рамке с ORC4 и ORC5 ВАВ для первого вектора, а для второго вектора, в одной рамке с областью перекрытия ORC3 и ORC4 и с ORC5. Рекомбинантный белок ко-трансляционно отсоединялся от белков вируса с помощью 2А пептидов. Для анализа работоспособности вирусных векторов вносились ген, кодирующий капсидный белок ВХПЛЯ и ген уЗФБ. Эффективность экспрессии гетерологичных генов анализировалась на уровне транскрипции и трансляции. Результаты гибридизации вирусной РНК со специфичной пробой, для двух вирусных векторов, показали наличие субгеномной РНК, кодирующей гетерологичный ген.

Денситометрический анализ для вирусного вектора на основе полного генома ВАВ показал, что количество субгеномной РНК для трансгена соответствует количеству субгеномной РНК для капсидного белка ВАВ немодифицированного генома. Эффективность накопления субгеномной РНК трансгена не снижается в вирусном векторе.

Денситометрический анализ для вирусного вектора с заменой ORC4 показал, что количество субгеномной РНК гетерологичных генов при агроинфильтрации нетрансгенных растений в 7 раз ниже по сравнению с количеством субгеномной РНК при агроинфильтрации трансгенных растений, несущих ген капсидного белка ВАВ. Аналогичная закономерность была прослежена при сравнении количества субгеномной РНК гетерологичного гена в вирусном векторе при агроинфильтрации нетрансгенного растения и количества субгеномной РНК капсидного белка ВАВ при агроинфильтрации нетрансгенного растения немодифицированным ВАВ. Отсутствие экспрессии капсидного белка в вирусном векторе приводит к предотвращению локального и соответственно системного транспорта, быстрой деградаци как геномной, так и субгеномных РНК, несмотря на наличие супрессора РНК-интерференции. Ввиду чего были созданы трансгенные растения, несущие ген капсидного белка ВАВ, для повышения количества целевого белка. При деконструировании генома, как правило, экспрессию вирусных белков, гены которых были удалены из вирусного генома, восстанавливают в транс-системах. За счет удаления вирусных генов, возможно внесение протяженных гетерологичных генов, получение большего количества целевого белка ввиду отсутствия конкуренции за энергетические ресурсы.

Анализ экспрессии рекомбинантных белков для двух разработанных вирусных векторов показал, что целевые белки экспрессируются в отделенном виде от вирусных белков. Количество гетерологичного белка для вектора на основе полного генома соответствует количеству капсидного белка ВАВ немодифицированного генома. Анализ эффективности экспрессии целевого белка в вирусном векторе с заменой ORC4 показал, что количество целевого

белка при агроинфильтрации нетрансгенных растений в 7 раз ниже по сравнению с количеством целевого белка и КБ ВАВ при агроинфильтрации трансгенных растений вирусным вектором и при агроинфильтрации нетрансгенного растения немодифицированным ВАВ соответственно. Отсутствие экспрессии капсидного белка значительно влияет на накопление как субгеномной РНК, кодирующей гетерологичный ген, так и самого целевого белка. Повышение эффективности экспрессии рекомбинантного белка возможно через восстановление экспрессии капсидного белка ВАВ в транс-системах, в данном случае путем создания трансгенных растений.

Полученные вирусные векторы на основе генома ВАВ являются стабильными, безопасными для окружающей среды, так как вирус ВАВ способен заражать только виноград и табак, шансы переноса трансгена очень низкие. Экспрессия гетерологичных белков сохраняется на нативном уровне вирусной экспрессии капсидного белка.

Для модификации был выбран геном изолята РА-3 (Италия), данный изолят при филогенетическом анализе распределяется в группу I. Изоляты данной группы обладают средней патогенностью и вызывают слабые поражения, что является очень важным для разработки вирусных векторов. Сильные поражения растения приводят к появлению обширных некротических зон и соответственно данные зоны не участвуют в накоплении целевых белков. Слабые поражения обусловлены пожелтением сосудов листовой пластинки и незначительными сворачиваниями листьев, при этом эффективность репликации вируса сохраняется.

Разработанные вирусные векторы на основе генома ВАВ могут использоваться для получения рекомбинантных белков в растениях путем агроинфильтрации целого растения, магнифекш метод. Векторы были апробированы путем экспрессии антигенов *Erwinia amylovora* и *Brucella abortus* в растениях (приложение К). Как было показано в ряде работ, данный метод является самым эффективным в накоплении большого количества целевого белка. Использование природной способности вирусов заражать растение, системно передвигаться по растению проходя множественные клеточные барьеры, а также бороться с РНК-интерференцией приводит к неспособности вируса заражать все клетки растений и синхронно распространяться по растению, что соответственно ведет к накоплению небольшого количества рекомбинантных белков. Объединение вирусной способности с высокой эффективностью реплицироваться в клетках растений и агробактериальной способности трансформировать клетки растений повышает в разы эффективность экспрессии рекомбинантных белков. Кроме того, при использовании комплексной технологии получение гетерологичного белка осуществляется через 4-10 дней после агроинфильтрации, в то время как получение рекомбинантного белка при природной вирусной инфекции (системное распространение вируса по растению) занимает 15-20 дней.

Разработанные векторы могут быть использованы для изучения функциональной геномики растений винограда, экономически важных сортов.

Ограниченный круг природных хозяев не позволяет использовать универсальный VIGS вектор для изучения функциональной геномики растений, ввиду чего разрабатываются вектора на основе геномов вирусов способных инфицировать тот или иной вид растения. Для изучения функциональной геномики винограда на данный момент не известно VIGS векторов, вирусы кандидаты для разработки таких векторов являются: вирус короткоузлиа винограда, вирус А винограда, вирусы, ассоциированные со скручиванием листьев винограда.

Разработанные векторы использовались для изучения методов борьбы с карантинными и особо опасными патогенами растений для обеспечения фитосанитарной безопасности Республики Казахстан (приложение Л).

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что изолят РА-3 вируса А винограда распределяется в 1-ю группу по результатам филогенетического анализа при использовании аминокислотных последовательностей РНК – зависимой РНК – полимеразы и капсидного белка.

2. Был разработан вирусный вектор на основе полного генома вируса А винограда путем внесения гетерологичного гена между ORC4 и ORC5.

3. Был разработан вирусный вектор путем деконструирования генома вируса А винограда, а именно была произведена замена ORC4 на гетерологичный ген.

4. Установлено, что уровень экспрессии гетерологичного белка в вирусном векторе на основе полного генома ВАВ соответствует уровню экспрессии капсидного белка в немодифицированном вирусе. Экспрессия гетерологичных белков происходит в разделенной форме от вирусных белков. ВАВ с дополнительным гетерологичным геном между ORC4 и ORC5 способен передвигаться по растению несмотря на наличие дополнительных 19 аминокислот на С-конце капсидного белка.

5. Были разработаны трансгенные растения *Nicotiana benthamiana*, несущие ген капсидного белка вируса А винограда. Экспрессия капсидного белка подтверждена иммуноблоттингом.

6. Выявлено, что уровень экспрессии гетерологичных белков в вирусном векторе с заменой ORC4 при агроинфильтрации трансгенных растений в 7 раз выше уровня экспрессии гетерологичных белков в нетрансгенных растениях. Эффективное получение рекомбинантных белков в векторе с заменой ORC4 возможно исключительно путем восстановления экспрессии капсидного белка ВАВ в транс – системах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Meng B., Martelli G., Golino D., Fuchs M. Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management. -Cham: Springer International Publishing, 2017. -P. 229-257.
2. Vidaver A.K., Lambrecht P.A. Bacteria as plant pathogens // The Plant Health Instructor. – 2004. -Vol.2. -P. 359-412.
3. Hull R. Matthew's Plant Virology. - Academic Press, 2002. - P.145-163.
4. Gleba Y., Tusé D., Giritch A. Plant Viral Vectors for Delivery by Agrobacterium // Curr Top Microbiol Immunol.- 2014. -Vol. 375. -P. 155-192.
5. Shamekova M, Mendoza M.R., Hsieh Y.C., Lindbo J., Omarov R.T., Scholthof H.B. Tombusvirus-based vector systems to permit over-expression of genes or that serve as sensors of antiviral RNA silencing in plants // Virology. – 2014. – Vol. 452. - P. 159-165.
6. Roossinck M. J. The good viruses: viral mutualistic symbioses // Nat Rev Microbiol.- 2011. -Vol.9, № 2. -P. 99-108.
7. Strange R.N., Scott P.R. Plant disease: a threat to global food security // Annu Rev Phytopathol. -2005. -Vol. 43. -P. 83-116.
8. Hull R. Matthew's Plant Virology. - Academic Press, 2002. - P. 4-24.
9. Loebenstein G., Gaba V. Viruses of potato // Adv Virus Res. - 2012. - Vol. 84. - P.209-246.
10. Hollandbeck G., DeWolf E., Todd T. Preliminary 2017 Kansas wheat disease loss estimates // Preliminary 2017 Kansas wheat disease loss estimates. - 2017. -P. 1-6.
11. Gray S., Gildow F.E. Luteovirus-aphid interactions // Annu Rev Phytopathol. -2003. -Vol. 41. -P. 539-566.
12. Morris J., Clover G.R.G., Harju V.A., Hugo S.A., Henry C.M. Development of a highly sensitive nested RT-PCR method for Beet necrotic yellow vein virus detection // Journal of Virological Methods. -2001. -Vol. 95. -P. 163-169.
13. Mohammadi M., Gibbs A.J., Hosseini A., Hosseini S. An Iranian genomic sequence of Beet mosaic virus provides insights into diversity and evolution of the world population // Virus Genes. -2018. -Vol. 54, № 2. -P.272-279.
14. Martelli G.P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents // Journal of Plant Pathology. -2014. -Vol. 96. -P. 1-136.
15. Martelli G.P., Adams M.J., Kreuse J.F., Dolja V.V. Family Flexiviridae: a case of study in virion and genome plasticity // Ann. Rev.Phytopathol. -2007. -Vol. 45. -P. 73-100.
16. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. -USA: Elsiever, 2011. -P.19-20.
17. Sardanyés J., Elena S.F. Error threshold in RNA quasispecies models with complementation // J. Theor. Biol. -2010. -Vol. 265. -P. 278-286.
18. Acosta-Leal R., Fawley M.W., Rush C.M. Changes in the intrasolate genetic structure of beet necrotic yellow vein virus populations associated with plant resistance breakdown // Virology, -2008, -Vol. 376. -P. 60-68.

19. Roossinck M.J. Changes in population dynamics in mutualistic versus pathogenic viruses // *Viruses*. -2011. -Vol. 3. -P. 12-19.
20. Silber G., Burk L.G. Infectivity of tobacco mosaic virus stored for fifty years in extracted 'unpreserved' plant juice // *Nature*. -1965. -Vol. 206. -P. 740-741.
21. Finch J.T. The hand of the helix of tobacco mosaic virus // *J. Mol. Biol.* -1972. -Vol. 66. -P. 291-294.
22. Namba K., Pattanayek R., Stubbs G. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus: refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fibre diffraction // *J. Mol. Biol.* -1989. -Vol. 208. -P. 307-325.
23. Namba K., Stubbs G., 1986. Structure of tobacco mosaic virus at 3.6 Å resolution: implications for assembly // *Science*. -1986. -Vol. 231. -P. 1401-1406.
24. Namba K., Caspar D.L.D., Stubbs G. Enhancement and simplification of macromolecular images // *Biophys. J.* -1988. -Vol. 53. -P. 469-475.
25. Parker L., Kendall A., Stubbs G., 2002. Surface features of potato virus X from fibre diffraction // *Virology*. -2002. -Vol. 300. -P. 291-295.
26. Kendall A., Bian W., Maris A., Azzo C., Groom J., et al. A common structure for the potexviruses // *Virology*. -2013. -Vol. 436. -P. 173-178.
27. Dobrov, E.N., Nemykh, M.A., Lukashina, E.V., Baratova, L.A., Drachev, V.A., et al. Modified model of the structure of the potato virus X coat protein // *Mol. Biol.* -2007. -Vol. 41. -P. 638-641.
28. Nemykh M.A., Efimov A.V., Novikov V.K., Orlov V.N., Arutyunyan A.M., et al. One more probable structural transition in potato virus X virions and a revised model of the virus coat protein structure // *Virology*. -2008. -Vol. 373. -P. 61-71.
29. Baratova L.A., Fedorova N.V., Dobrov E.N., Lukashina E.V., Kharlanov A.N., et al. N-terminal segment of potato virus X coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of bound water shell on the virion surface // *Eur. J. Biochem.* -2004. -Vol. 271. -P. 3136-3145.
30. Klug A., Caspar D.L.D. The structure of small viruses // *Adv. Virus Res.* -1961. -Vol. 7. -P. 225-325.
31. Belyi V.A., Muthukumar M. Electrostatic origin of the genome packing in viruses // *Proc. Natl. Acad. Sci.* -2005. -Vol. 103. -P. 17174-17178.
32. Zandi R., van der Schoot P., Reguera D., Kegel W., Reiss H. Classical nucleation theory of virus capsids // *Biophys. J.* -2006. -Vol. 90. -P. 1939-1948.
33. Lu G., Zhou Z.H., Baker M.L., Jakana J., Cai D. Structure of double-shelled rice dwarf virus // *J. Virol.* -1998. -Vol. 72. -P. 8541-8549.
34. Wu B., Hammar L., Xing L., Markarian S., Yan J., et al. Phytoreovirus T = 1 core plays critical roles in organizing the outer capsid of T = 13 quasiequivalence // *Virology*. -2000. -Vol. 271. -P. 18-25.
35. Zhou Z.H., Baker M.L., Jiang W., Dougherty M., Jakana J., et al. Electron microscopy and bioinformatics suggest protein fold models for rice dwarf virus // *Nat. Struct. Biol.* -2001. -Vol. 8. -P. 868-873.

36. Nakagawa A., Miyazaki N., Taka J., Naitow H., Ogawa A., et al. The atomic structure of rice dwarf virus reveals the self-assembly mechanism of component proteins // *Structure*. -2003. -Vol. 11. -P. 1227-1238.
37. Jackson A.O., Dietzgen R.G., Goodin M.M., Bragg J.N., Deng M. Biology of plant rhabdoviruses // *Annu. Rev. Phytopathol.* -2005. -Vol. 43. -P. 623-660.
38. Okada R., Kiyota E., Sabanadzovic S., Moriyama H., Fukuhara T., et al. Bell pepper endornavirus: molecular and biological properties, and occurrence in the genus *Capsicum* // *J. Gen. Virol.* - 2011. -Vol. 92. -P. 2664-2673.
39. Baltimore D. Expression of animal virus genomes // *Bacteriol. Rev.* -1971. -Vol. 35. -P. 235-241.
40. Koonin E. V., and Dolja V. V. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* -1993. -Vol. 28. -P. 375-430.
41. Koonin E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses // *J. Gen. Virol.* -1991. -Vol. 72. -P. 2197-2206.
42. Agranovsky A. A., Koonin E. V., Boyko V. P., Maiss E., Frötschl R., Lunina N. A., Atabekov J. G. Beet yellows closterovirus: Complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol proteinase // *Virology*. -1994. -Vol. 198. -P. 311-324.
43. Gorbalenya A. E., Koonin E. V. Helicases: Amino acid sequence comparisons and structurefunction relationships // *Curr. Opin. Cell Biol.* -1993. -Vol. 3. -P. 419-429.
44. Dougherty W. G., Semler B. L. Expression of virus-encoded proteinases: Functional and structural similarities with cellular enzymes // *Microbiol. Rev.* -1993. -Vol. 57. -P. 781-822.
45. Zanotto P. M., Gibbs M. J., Gould E. A., Holmes E. C. A reevaluation of the higher taxonomy of viruses based on RNA polymerases // *J. Virol.* -1996. -Vol. 70. -P. 6083-6096.
46. Buck K. W. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals // *Adv. Virus Res.* -1996. -Vol. 47. -P. 159-251.
47. Kadaré G., Haeni A.L. Virus-encoded helicases // *J. Virol.* -1997. -Vol. 71. -P. 2583-2590.
48. Pogue G. P., Huntley C. C., Hall, T. C. Common replication strategies emerging from the study of diverse groups of positive-strand virus // *Arch. Virol.* - 1994. -Vol. 9. -P. 181-194.
49. Duggal R., Lahser F. C., Hall T. C. cis-Acting sequences in the replication of plant viruses with plus-sense RNA genomes // *Annu. Rev. Phytopathol.* -1994. -Vol. 32. -P. 287-309.
50. Gamarink A. V., Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus // *Genes Dev.* -1998. -Vol. 12. -P. 2293-2304.
51. Chen J., Noueiry A., Ahlquist P. Brome mosaic virus protein 1a recruits viral RNA2 to RNA replication through a 5'-proximal RNA2 signal // *J. Virol.* - 2001. -Vol. 75. -P. 3207-3219.

52. Dreher T. W. Functions of 3'-untranslated regions of positive-stranded RNA viral genomes // *Annu. Rev. Phytopathol.* -1999. -Vol. 37. -P. 151-174.
53. Buck K. W. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals // *Adv. Virus Res.* -1996. -Vol. 47. -P. 159-251.
54. Miller W. A., Koev G. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses // *Virology.* -2000. -Vol. 273. -P. 1-8.
55. Delgui L.R., Rodríguez J.F. Virus maturation // *Subcell Biochem.* -2013. -Vol. 68. -P. 395-415.
56. Hayes R. J., Pereira V. C. A., Buck K. W. et al. Plant proteins that bind to the 3'-terminal sequences of the negative-strand RNA of three diverse positive-strand RNA plant viruses // *FEBS Lett.* -1994. -Vol. 352. -P. 331-334.
57. Héricourt F., Jupin I., Haenni A.L. Genome of RNA viruses. In: Mandahar C. L. *Molecular Biology of Plant Viruses* // Kluwer Academic Publishers. -1999. -P. 1-28.
58. Gallie D. R. Cap-independent translation conferred by the 5'-leader of Tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent // *J. Virol.* -2001. -Vol. 75. -P. 12141-12152.
59. Gallie D. R., Kobayashi M. The role of the 3'-untranslated region in non-polyadenylated plant viral mRNAs in regulating translational efficiency // *Gene.* -1994. -Vol. 142. -P. 159-165.
60. Gallie D. R., Walbot V. RNA pseudoknot domain of Tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells // *Genes Dev.* -1990. -Vol. 4. -P. 1149-1157.
61. Leathers V., Tanguay R., Kobayashi M., Gallie D. R. A phylogenetically conserved sequence within viral 3'-untranslated RNA pseudoknots regulates translation // *Mol. Cell. Biol.* -1993. -Vol. 13. -P. 5331-5337.
62. Guo L., Allen E. M., Miller W. A. Base-pairing between untranslated regions facilitates translation of uncapped, nonpolyadenylated viral RNA // *Mol. Cell.* -2001, -Vol. 7. -P. 1103-1109.
63. Gorbalenya A. E., Koonin E. V., Wolf Y. I. A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses // *FEBS Lett.* -1990. -Vol. 262. -P. 145-148.
64. Wu B., Grigull J., Ore M., Morin S., White K. Global Organization of a Positive-strand RNA Virus Genome // *PLoS Pathog.* -2013. -Vol. 9, № 5. -P. 1-15.
65. ElSawy K.M., Caves L.S., Twarock R. On the origin of order in the genome organization of ssRNA viruses // *Biophys J.* -2011. -Vol. 101. -P. 774-780.
66. Global economic vitiviniculture data // International Organisation of Vine and Wine. -2016.
67. Martelli G.P. Directory of virus and virus-like diseases of the Grapevine and their agents // *Journal of Plant Pathology.* -2014. -Vol. 96. -P. 1-136.
68. Ouertani R., Savino V., Minafra A., Boscia D., Castellano M.A., Martelli G.P., Greco N. Properties of a previously undescribed grapevine nepovirus from Tunisia // *Archives of Virology.* -1992. -Vol. 126. -P. 107-117.
69. Elbeainoa M., Digiaroa M., Ghebremeskela S., Martelli G.P. Grapevine deformation virus: Completion of the sequence and evidence on its origin from

recombination events between Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus // *Virus Research*. -2012. -Vol. 166. -P. 136-140.

70. Hajizadeh M., Sokhandan-Bashir N., Elbeaino T. First report of Grapevine deformation virus and Grapevine Anatolian ringspot virus in Iran // *Journal of Plant Pathology*. -2012. -Vol. 94. -P. S4.96.

71. Pinck M., Reibolt J., Loudes A.M., Loret M., Pinck L. Primary structure and location of genome-linked protein (VPg) of Grapevine fanleaf nepovirus // *FEBS Letters*. -1991. -Vol. 284. -P. 117-119.

72. Martelli, G.P., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Agranowsky A.A., Al Rawhani M., Dolja V.V. et al. Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated member of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family // *Journal of Plant Pathology*. -2012. -Vol. 94. -P. 7-19.

73. Almeida R., Daane K., Bell V., Blaisdell G., Cooper M. et al. Ecology and management of grapevine leafroll disease // *Front Microbiol*. -2013. -Vol. 4. -P. 1-13.

74. Thompson J.R., Fuchs M., Fischer K.F., Perry K.L. Macroarray detection of grapevine leafroll-associated viruses // *J Virol Methods*. - 2012. -Vol. 183. -P.161-169.

75. Krügerl K., Saccaggi D.L., van der Merwe M., Kasdorf G.G.F. Transmission of Grapevine Leafroll-associated Virus 3 (GLRaV-3): Acquisition, inoculation and retention by the mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (hemiptera: Pseudococcidae) // *S. Afr. J. Enol. Vitic*. -2015. -Vol. 36. -P. 223-230.

76. Golino D.A., Weber E., Sim S., Rowhani A. Leafroll disease is spreading rapidly in a Napa Valley vineyard // *California Agriculture*. -2008. -Vol. 62. -P. 156-160.

77. Golino D.A., Sim S.T., Gill R., Rowhani A. Californian mealybugs can spread leafroll // *California Agriculture*. -2002. -Vol. 56. -P. 196-201.

78. Tsai C.W., Rowhani A., Golino D.A., Daane K.M., Almeida R.P. Mealybug transmission of Grapevine leafroll viruses: an analysis of virus-vector specificity // *Phytopathology*. - 2010. -Vol. 100. -P. 830-834.

79. Belli G., Fortusini A., Casati P., Belli L., Bianco P.A., Prati S. Transmission of a grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect *Pulvinaria vitis* L. *Rivista di Patologia // Vegetale*. -1994. -Vol. 4. -P. 105-108.

80. Daane K.M., Almeida R.P.P., Bell V.A., Walker J.T.S., Botton M., Fallahzadeh M., Mani M., Miano J.L., Sforza R., Walton V.M., Zaviezo T. Biology and management of mealybugs in vineyards. In *Arthropod management in vineyards: Pests, approaches, and future directions*, ed. Bostanian N.J., Vincent C., Isaacs R. New York: Springer. -2012. -P.271–307.

81. Glasa M., Predajňa L., Šoltys K., Sihelská N., Nagyová A., Wetzel T., Sabanadzovic S. Analysis of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus in Slovakia Reveals Differences in Intra-Host Population Diversity and Naturally Occurring Recombination Events // *Plant Pathol J*. -2017. -Vol. 33. -P. 34-42.

82. Martelli G.P., Lehoczky J., Quacquarelli A., Sarospataki G. A disorder resembling “legno riccio” (rugose wood) of grapevine in Hungary // *Phytopathologia Mediterranea*. -1967. -Vol. 6. -P. 110-112.

83. Martelli G.P., Minafra A., Saldarelli P. Vitivirus, a new genus of plant viruses // *Archives of Virology*. -1997. -Vol. 142. -P. 1929-1932.

84. Martelli G.P., Jelkmann W. Foveavirus, a new plant virus genus // Archives of Virology. -1998. -Vol. 142. -P. 1245-1249.
85. Maliogka V.I., Martelli G.P., Fuchs M., Katis N.I. Control of viruses infecting grapevine // Advances in Virus Research . -2015. -Vol. 91. -P. 175-227.
86. Martelli G.P., Adams M.J., Keuze J.F., Dolja V.V. Family Flexiviridae: A case study in virion and genome plasticity // Annual Review of Phytopathology. -2007. -Vol. 45. -P. 73-100.
87. Maliogka V.I., Martelli G.P., Fuchs M., Katis N.I. Control of viruses infecting grapevine // Advances in Virus Research. -2015. -Vol. 91. -P. 175-227.
88. Martelli G.P., Sabanadzovic S., Abou-Ghanem Sabanadzovic N., Edwards M.C., Dreher T. The family Tymoviridae // Archives of Virology. -2002. -Vol. 147. -P. 1837-1846.
89. Bota J., Cretazzo E., Montero R., Rosselló J., Cifre J. Grapevine fleck virus (GFkV) elimination in a selected clone of Vitis vinifera L. cv. Manto Negro and its effects on photosynthesis // Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. -2014. -Vol. 48. -P. 11-19.
90. Mudge K., Janick J., Scofield S., Goldschmidt E.E. A history of grafting // Horticultural Reviews. -2009. -Vol. 35. -P. 437-493.
91. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., Fuchs, M. Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management. - Springer International Publishing, 2017.
92. Čepin, U., Gutiérrez-Aguirre I., Ravnika M., Pompe- M. Frequency of occurrence and genetic variability of Grapevine fanleaf virus satellite RNA // Plant Pathology. -2015. -Vol. 65. -P. 510-520.
93. Rathay E. Die Gabler oder Zwiewipflereben // Österreichs Botanische Zeitschrift. -1882. -Vol. 32. -P. 316-320.
94. Le Maguet J., Beuve M., Herrbach E., Lemaire O. Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by Phenacoccus aceris // Phytopathology. -2012. -Vol. 102. -P. 717-23.
95. Cholin J.J. Beobachtungen über die "Reisigkrankheit" der Reben an Ahr // Mitteilung über Weinbau und Kellerwirtschaft. -1896. -Vol. 8. -P. 63-64.
96. Van Ghelder C., Reid A., Kenyon D., Esmenjaud D. Detection of Nepovirus Vector and Nonvector Xiphinema Species in Grapevine // Methods Mol Biol. -2015. -Vol. 1302. -P. 149-159.
97. Hemmer C., Djennane S., Ackerer L., Hleibieh K., Marmonier A. et al. Nanobody-mediated resistance to Grapevine fanleaf virus in plants // Plant Biotechnol J. -2018. -Vol. 16. -P. 660-671.
98. Schellenberger P., Sauter C., Lorber B., Bron P., Trapani S. et al. Structural insights into viral determinants of nematode mediated Grapevine fanleaf virus transmission // PLoS Pathog. -2011. -Vol. 7. -P. 1-14.
99. Gottula J., Lapato D., Cantilina K., Saito S., Bartlett B., Fuchs M. Genetic variability, evolution, and biological effects of Grapevine fanleaf virus satellite RNAs // Phytopathology. -2013. -Vol. 103. -P. 1180-1187.
100. Lo P.L., Walker J.T.S. Soil applications of two neonicotinoid insecticides to control mealybugs (Pseudococcidae) in vineyards // New Zealand Plant Protection. -2011. -Vol. 64. -P. 101-106.

101. Lo P.L., Bell V.A., Walker J.T.S. Maximising the effectiveness of insecticides to control mealybugs in vineyards // *New Zealand Plant Protection*. -2009. -Vol. 62. -P. 296-301.
102. Walker M., Chisholm J., Wei T., Ghoshal B., Saeed H., Rott M., Sanfaçon H. Complete genome sequence of three Tomato ringspot virus isolates: evidence for reassortment and recombination // *Archives of Virology*, -2015, -Vol. 160. -P. 543-548.
103. Al Rwahnih M., Daubert S., Golino D., Islas C., Rowhani A. Comparison of Next-Generation Sequencing Versus Biological Indexing for the Optimal Detection of Viral Pathogens in Grapevine // *Phytopathology*. -2015. -Vol.105. -P. 758-63.
104. Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Fuchs M. Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry // *Journal of Plant Pathology*. -2004a. -Vol. 86. -P. 183-195.
105. van Zyl S., Vivier M.A., Walker M.A. Xiphinema index and its Relationship to Grapevines: A review // *South African Journal for Enology and Viticulture*. -2016. -Vol. 33. -P. 21-32.
106. Armijo G., Schlechter R., Agurto M., Muñoz D., Nuñez C., Arce-Johnson P. Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios // *Front Plant Sci*. -2016. -Vol. 7. -P. 1-18.
107. Alabi O.J., Casassa L.F., Gutha L.R., Larsen R.C., Henick-Kling T., Harbertson J.F., Naidu R.A. Impacts of Grapevine Leafroll Disease on Fruit Yield and Grape and Wine Chemistry in a Wine Grape (*Vitis vinifera* L.) Cultivar // *PLoS One*. -2016. -Vol. 11. -P. 1-18.
108. Fan X., Hong N., Dong Y., Ma Y., Zhang Z.P., Ren F., Hu G., Zhou J., Wang G. Genetic diversity and recombination analysis of grapevine leafroll-associated virus 1 from China // *Archives of Virology*. -2015. -Vol. 160. -P. 1669-1678.
109. Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R., Malossini U., Yoshikawa N., La Notte P., Terlizzi F., Credi R., Saldarelli P. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris // *Virus Research*. -2012. -Vol. 163. -P. 262-268.
110. Endeshaw S.T., Sabbatini P., Romanazzi G., Schilder A.C., Neri D. Effects of grapevine leafroll associated virus 3 infection on growth, leaf gas exchange, yield and basic fruit chemistry of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet franc // *Scientia Horticulturae*. -2014. -Vol. 170. -P. 228-236.
111. Komar V., Vigne E., Demangeat G., Lemaire O., Fuchs M. Comparative Performance of Virus-Infected *Vitis vinifera* cv. Savagnin rose Grafted onto Three Rootstocks // *American Journal of Enology and Viticulture*. -2010. -Vol. 61. -P. 68-73.
112. Martíneza L., Miranda C., Royo J., Urrestarazu J., de Toda F., Balda P., Santesteban L. Direct and indirect effects of three virus infections on yield and berry composition in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. ‘Tempranillo’ // *Scientia Horticulturae*. -2016. -Vol. 212. -P. 20-28.

113. Naidu R.A., Maree H.J., Burger J.T. Grapevine leafroll disease and associated viruses: a unique pathosystem // *Annu Rev Phytopathol.* -2015. -Vol. 53. -P. 613-634.
114. Mannini F., Mollo A., Credi R. Field performances and wine quality modification in a clone of Dolcetto (*Vitis vinifera* L.) after GLRaV-3 elimination // *American Journal of Enology and Viticulture.* -2012. -Vol. 63. -P. 144-147.
115. Jones T., Rayapati N., Nita M. Occurrence of Grapevine leafroll associated virus-2, -3 and Grapevine fleck virus in Virginia, U.S.A., and factors affecting virus infected vines // *European Journal of Plant Pathology.* -2015. -Vol. 142. -P. 209-222.
116. Montero R., Mundy D., Albright A., Grose C., Trought M.C., Cohen D., Chooi K.M., MacDiarmid R., Flexas J., Bota J. Effects of Grapevine Leafroll associated Virus 3 (GLRaV-3) and duration of infection on fruit composition and wine chemical profile of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc // *Food Chem.* -2016. -Vol. 197. -P. 1177-1183.
117. Kumar S., Singh L., Ferretti L., Barba M., Zaidi A., Hallan V. Evidence of Grapevine leafroll associated virus-1–3, Grapevine fleck virus and Grapevine virus B Occurring in Himachal Pradesh, India // *Indian J Virol.* -2013. -Vol. 24. -P. 66-69.
118. Goszczynski D. E. Brief report of the construction of infectious DNA clones of South African genetic variants of grapevine virus A and grapevine virus B // *Springerplus.* -2015. -Vol. 4. -P. 739.
119. Kumar S., Rai R., Baranwal V. K. Development of an immunocapture–reverse transcription–polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) using modified viral RNA release protocol for the detection of Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) // *Phytoparasitica.* - 2015. -Vol. 43. -P. 311-316.
120. Burger J.T., Maree H.J. Metagenomic next-generation sequencing of viruses infecting grapevines // *Methods Mol Biol.* -2015. -Vol. 1302. -P. 315-30.
121. Hommay G., Komar V., Lemaire O., Herrbach E. Grapevine virus A transmission by larvae of *Parthenolecanium corni* // *European Journal of Plant Pathology.* -2008. -Vol. 121. -P. 185-188.
122. Bertin S., Cavalieri V., Gribaudo I., Sacco D., Marzachi C., Bosco D. Transmission of Grapevine virus A and Grapevine leafroll-associated virus 1 and 3 by *Helicoverpa bohemica* (Hemiptera: Pseudococcidae) Nymphs From Plants With Mixed Infections // *J Econ Entomol.* -2016. -Vol. 109. -P.1504-11.
123. Fuller K., Alston J., Golino D. The Economic Benefits from Virus-Screening: A Case Study of Grapevine Leafroll in the North Coast of California // *Am J Enol Vitic.* -2015. -Vol. 66. -P. 112-119.
124. Cui Z.H., Bi W.L., Pan C., Xu Y., Wang Q.C. Abiotic stress improves in vitro biological indexing of Grapevine leafroll-associated virus-3 in red grapevine cultivars // *Australian journal of grape and wine research.* -2015. -Vol. 21. -P. 490-495.
125. Pedro T., Gammoudi N., Peiró R., Olmos A., Gisbert C. Somatic embryogenesis from seeds in a broad range of *Vitis vinifera* L. varieties: rescue of true-to-type virus-free plants // *BMC Plant Biol.* -2017. -Vol. 17. -P. 1-12.

126. Perrone I., Chitarra W., Boccacci P., Gambino G. Grapevine-virus-environment interactions: an intriguing puzzle to solve // *New Phytol.* -2017. -Vol. 213. -P. 983-987.
127. Bertamini M., Muthuchelian K., Nedunchezian N. Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein) // *Journal of Phytopathology.* -2004. -Vol. 152. -P. 145-152.
128. Blaisdell G.K., Cooper M.L., Kuhn E.J., Taylor K.A., Daane K.M., Almeida R.P.P. Disease progression of vector-mediated Grapevine leafroll-associated virus 3 infection of mature plants under commercial vineyard conditions // *Eur J Plant Pathol.* -2016. -Vol. 146. -P. 105- 116.
129. Gutha L.R., Alabi O.J., Naidu R.A. Effects of grapevine leafroll disease on photosynthesis in a red-fruited wine grape cultivar. In *Proceedings 17th ICVG meeting*, Davis, CA, USA, 2012, 168-169.
130. Atallah S.S., Gomez M.I., Fuchs M.F., Martinson T.E. Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York // *American Journal of Enology and Viticulture.* -2012.- Vol. 63. -P. 73-79.
131. Al Rwahnih M., Dolja V.V., Daubert S., Koonin E.V., Rowhani A. Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family *Closteroviridae* // *Virus Research.* -2012. -Vol. 163. -P. 302-309.
132. Naidu R.A., Rowhani A., Fuchs M., Golino D., Martelli G.P. Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop // *Plant Disease.* - 2014. -Vol. 98. -P. 1172-1185.
133. Naidu R.A., Maree H.J., Burger J. Grapevine leafroll disease and associated viruses – A unique pathosystem // *Annual Review of Phytopathology.* - 2015. -Vol. 53. -P. 613-634.
134. Maliogka V.I., Dovas C.I., Katis N.I. Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the *Ampelovirus* genus // *Virus Researc.* -2008. -Vol. 135. -P. 125-135.
135. Habili N., Komínek P., Little A. Grapevine leafroll-associated virus 1 as a common grapevine pathogen // *Plant Viruses.* -2007. -Vol. 1. -P. 63–68.
136. Sabella E., Pierro R., Luvisi A., Panattoni A., D’Onofrio C., Scalabrelli G., Nutricati E., Aprile A., De Bellis L., Materazzi A. Phylogenetic analysis of viruses in Tuscan *Vitis vinifera sylvestris* (Gmel.) Hegi // *PLoS One.* -2018. -Vol. 13. -P. 1-16.
137. Moradi R., Koolivand D. Eini O., Hajizadeh M. Phylogenetic analysis of two Iranian grapevine virus A isolates using coat protein gene sequence // *Iranian journal of genetics and plant breeding.* -2017. -Vol. 6. - P. 48-56.
138. Ipach U., Kling L. Grapevine virus A in Rheinland-Pfalz: Vorkommen und Bedeutung für den deutschen Weinbau // *Gesunde Pflanzen.* -2008. -Vol. 60. -P. 63–66.

139. Misbeh S., Al-Musa A., Anfoka G., Salem N. Molecular characterization of Grapevine virus A isolates from Jordan // *Phytopathology mediterranea*. -2007. Vol. 46. -P. 195-200.
140. Goszczynski D.E., du Preez J., Burger J.T. Molecular divergence of Grapevine virus A (GVA) variants associated with Shiraz disease in South Africa // *Virus Res*. -2008. -Vol. 138. -P. 105-110.
141. Goszczynski D.E. Single-strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing of grapevine virus A (GVA) reveal a close association between related molecular variants of the virus and Shiraz disease in South Africa // *Plant Pathol*. -2007. -Vol. 56. -P. 755–762.
142. Valat L., Burrus M., Fuchs M., Mauro M-C. Review of Techniques to Inoculate Grapevines with Grapevine Fanleaf Virus: Lessons and Perspectives // *Am J Enol Vitic*. -2003. -Vol. 54. -P. 279 - 285.
143. Osman F., Hodzic E., Omanska-Klusek A., Olineka T., Rowhani A. Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of Grapevine virus A, B and D // *J Virol Methods*. -2013. -Vol. 194. -P. 138-145.
144. Conti M., Milne R.G., Luisoni E., Boccardo G. A closterovirus from a stem pitting-diseased grapevine // *Phytopathology*. -1980. -Vol. 70. -P. 394-399.
145. Luring A.S., Frydman J., Andino R. The role of mutational robustness in RNA virus evolution // *Nat Rev Microbiol*. -2013. -Vol. 11. -P. 327-336.
146. Farooq A.B., Ma Y.X., Wang Z., Zhuo N., Wenxing X., Wang G.P., Hong N. Genetic diversity analyses reveal novel recombination events in Grapevine leafroll-associated virus 3 in China // *Virus Res*. -2013. -Vol.171. -P. 15-21.
147. Minafra A., Saldarelli P., Martelli G.P. GVA: nucleotide sequence, genome organization, and relationship in the Trichovirus genus // *Arch. Virol*. -1997. -Vol. 142. -P. 417-423.
148. Aravind L., Koonin E.V. The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and irondependent dioxygenases // *Genome Biol*. -2001. -Vol.2. -P. 1-8.
149. Martelli G.P. Grapevine virology highlights 2006-2009 // *Extended abstracts of ICVG, 16th Meeting*. - France, 2009. -P. 15-23.
150. Halgren A., Tzanetakis I.E., Martin R.R. Identification, characterisation and detection of black raspberry necrosis virus // *Phytopathology*. -2007. -Vol. 97. -P. 44-50.
151. Susaimuthu J., Tzanetakis I.E., Gergerich R.C., Martin R.R. A member of a new genus in the Potyviridae infects Rubus // *Virus Res*. -2008. -Vol. 131. -P. 145–151.
152. Maliogka V.I., Dovas C.I., Lotos L., Efthimiou K., Katis N.I. Complete genome analysis and immunodetection of a member of a novel virus species belonging to the genus ampelovirus // *Archives in virology*. -2009. -Vol. 154. -P. 209-218.
153. Dolja V.V. New developments in understanding gene functions and evolution of the grapevine closteroviruses // *Extended abstracts of ICVG, 16th Meeting*. - France, 2009. -P. 29-31.
154. van den Born E., Omelchenko M.V., Bekkelund A., Leihne V., Koonin E.V., Dolja V.V., Falnes P. Viral AlkB proteins repair RNA damage by oxidative demethylation // *Nucleic Acids Research*. -2008. - Vol. 36. -P. 5451–5461.

155. Barr J.N., Fearn R. How RNA viruses maintain their genome integrity // *J Gen Virol.* -2010. -Vol.91. -P.1373-87.
156. Zhou Z.Sh., Dell'Orco M., Sardarelli P., Turturo C., Minafra A., Martelli G.P. Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of Grapevine virus A // *J. Gen. Virol.* -2006. - Vol.87. -P. 2387–2395.
157. Chiba M., Reed J.C., Prokhnevsky A.I., Chapman E.J., Mawassi M., Koonin E.V., Carrington J.C., Dolja V.V. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon // *Virology.* -2006. -Vol. 346. -P. 7–14.
158. Mawassi M. The Vitivirus Grapevine virus A: a 'Small' but Surprising Virus // *Phytoparasitica.* -2007. -Vol. 35. -5 p.
159. Tanne E., Ben-Dov Y., Raccach B. Transmission of the corky-bark disease by the mealy bug *Planococcus ficus* // *Phytoparasitica.* -1989. -Vo. 17. - 55 p.
160. Goszczynski D.E., Jooste A.E.C. Identification of divergent variants of Grapevine Virus A // *European Journal of Plant Pathology.* -2003b. - Vol.109. -P. 397-403.
161. Carstens R. Double stranded RNA studies on Shiraz disease in South Africa // *Extended abstracts 12th Meeting ICVG.* - Lisbon, 1997. - 44 p.
162. Agran M.K., Terlizzi B., Boscia D., Minafra A., Savino V., Martelli G.P., Askri F. Occurrence of Grapevine virus A (GVA) and other closteroviruses in Tunisian grapevines affected by leafroll // *Vitis.* -1990. -Vol. 29. -P. 43–48.
163. Digiario M., Popovic Bedzrob M., Popovic Bedzrob M., D'Onghia A.M., Boscia D., Savino V. On the correlation between grapevine virus A and rugose wood // *Phytopathologia Mediterranea.* - 1994. -Vol. 33. -P. 187 -193.
164. M'hirsi S., Fattouch S., Acheche H., Marrakchi M., Marzouki N. Detection of grapevine A vitivirus in Tunisian grapevines // *Bulletin OEPP/EPPO.* - 2001. -Vol. 31. -P. 509–513.
165. Nickel O., Fajardo T.V.M., Aragão F.J.L., Chagas C.M., Kuhn G.B. Detection and coat protein gene characterization of an isolate of Grapevine virus B from corky bark-affected grapevines in southern Brazil // *Fitopatologia Brasileira.* - 2002. -Vol. 27. -P. 279–284.
166. Velasco R., García B., Hita I., Padilla V. Detection of Grapevine virus B associated to rugose wood (corky bark) symptoms in grapevine cv. Napoleon in Murcia (Spain) // *Plant Pathology.* -2005. -Vol. 54. - 264 p.
167. Nakaune R., Inoue K., Nasu H., Kakogawa K., Nitta H., Imada J., Nakano M. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of Rupestris stem pitting-associated virus // *Journal of General Plant Pathology.* -2008a. -Vol. 74. -P. 156–163.
168. Voncina D., Simon S., Dermic E., Cvjetkovic B., Pejic I., Maletic E., Kontic J.K. Differential properties of Grapevine virus B isolates from Croatian autochthonous grapevine cultivars // *Journal of Plant Pathology.* -2011. -Vol. 93. -P. 283–289.
169. Anfoka G.H., Shahrour W., Nakhla M.K. Detection and molecular characterization of Grapevine virus A in Jordan // *Phytopathologia Mediterranea.* - 2004. -Vol. 43. -P. 387–394.

170. Wang J., Xi D., Liu J., Chen K., Li H., Liu X., Yuan S., Ercişli S., Lin H. Genetic variability in Grapevine virus A from *Vitis vinifera* L. x *Vitis labrusca* L. in Sichuan, China // *Turkish Journal of Biology*. -2012. -Vol. 36. -P. 542–551.
171. Klaassen V.A., Sim S.T., Dangl G.S., Osman F., Al Rwahnih M., Rowhani A., Golino D.A. *Vitis californica* and *Vitis californica* x *Vitis vinifera* hybrids are hosts for Grapevine leafroll-associated virus-2 and -3 and Grapevine virus A and B // *Plant Disease*. -2011. -Vol. 95. -P. 657–665.
172. Rosciglione B., Castellano M.A., Martelli G.P., Savino V., Cannizzaro G. Mealybug transmission of Grapevine virus A // *Vitis*. -1983. -Vol. 22. -P. 331–347.
173. Rosciglione B., Castellano M.A. Further evidence that mealybugs can transmit Grapevine virus A (GVA) to herbaceous hosts // *Phytopathologia Mediterranea*. -1985. - Vol. 24. -P. 186–188.
174. Tanne E., Ben-Dov Y., Raccach B. Transmission of the corky-bark disease by the mealybug *Planococcus ficus* // *Phytoparasitica*. -1989a. -Vol. 17. - 55 p.
175. Tanne E., Marcus R., Dubitzky E., Raccach B. Analysis of progress and spatial pattern of corky bark in grapes // *Plant Disease*. -1996. -Vol. 80. -P. 34–38.
176. Alliaume A., Reinbold C., Uzest M., Beuve M., Hommay G., Lemaire O., Herrbach E. Transmission studies of the Grapevine leafroll-associated virus 1 and the Grapevine virus A by the mealybug *Phenacoccus aceris* // *Proceedings of the 18th Congress of ICVG*. - Ankara, 2015. -P. 110–111.
177. Hogenhout S.A., Ammar E.D., Whitfield A.E., Redinbaugh M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses // *Annu. Rev. Phytopathol.* - 2008. -Vol. 46. -P. 327–359.
178. Ng J.C.K., Zhou J.S. Insect vector-plant virus interactions associated with non-circulative, semi-persistent transmission: Current perspectives and future challenges // *Curr. Opin. Virol.* - 2015. -Vol. 15. -P. 48–55.
179. Doolittle S.P., Walker M.N. Aphid transmission of cucumber mosaic // *Phytopathology*. -1928. -Vol. 18. -143 p.
180. Lai M. M. C. Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: A parallel to DNA-dependent RNA transcription // *Virology*. -1998. - Vol. 244. -P. 1-12.
181. de Graaff M., Coscoy L., Jaspars E. M. Localization and biochemical characterization of alfalfa mosaic virus replication complexes // *Virology*. -1993. - Vol. 194. -P. 878–881.
182. Restrepo-Hartwig M. A., Ahlquist P. Brome mosaic virus helicase- and polymerase-like proteins colocalize on the endoplasmic reticulum at sites of viral RNA synthesis // *J. Virol.* -1996. -Vol. 70. -P. 8908-8916.
183. Chen M.-H., Roossinck M. J., Kao C. C. Efficient and specific initiation of subgenomic RNA synthesis by cucumber mosaic virus replicase in vitro requires an upstream RNA stem-loop // *J. Virol.* -2000. -Vol. 74. -P.11201-11209.
184. den Boon J. A., Chen J., Ahlquist P. 2001. Identification of sequences in brome mosaic virus replicase protein 1a that mediate association with endoplasmic reticulum membranes // *J. Virol.* -2001. -Vol. 75. -P. 12370-12381.

185. Ahlquist P., Noueiry A. O., Lee W.-M., Kushner D. B., Dye B. T. Host factors in positivestrand RNA virus genome replication // *J. Virol.* -2003. -Vol. 77. -P. 8181-8186.
186. Noueiry A. O., Ahlquist P. Brome mosaic virus RNA replication: Revealing the role of the host in RNA-virus replication // *Annu. Rev. Phytopath.* - 2003. -Vol. 41. -P. 77-98.
187. Boguszevska-Chachulska A. M., Haenni A.-L. RNA viruses redirect host factors to better amplify their genomes // *Adv. Virus Res.* -2005. - Vol. 65. -P. 29-61.
188. Galiakparov N., Goszczynski D.E., Che X., Batuman O., Bar-Joseph M., Mawassi M. Two classes of subgenomic RNA of grapevine virus A produced by internal controller elements // *Virology.* -2003. -Vol. 312. -P. 434-48.
189. Sevilem I., Yadav R. Sh., Helariutta Y. Plasmodesmata: Channels for Intercellular Signaling During Plant Growth and Development // *Methods Mol Biol.* - 2015. - Vol. 1217. -P. 3-24.
190. Копытина Д.А., Касенова А.М., Качиева З.Х., Омашева М., Галиакпаров Н.Н. Молекулярные основы иммунитета растений // *Биотехнология теория и практика.* - 2012. -Vol. 3. -P. 31-41.
191. Kumar D., Kumar R., Hyun T.K., Kim J-Y. Cell-to-cell movement of viruses via plasmodesmata // *Journal of Plant Research.* - 2014. - Vol.128. -P. 37-47.
192. Galiakparov N., Tanne E., Sela I., Gafny R. Functional analysis of the grapevine virus A genome // *Virology.* -2003. -Vol. 306. -P. 42-50.
193. Deryabina N.D., Gritsenko D.A., Galiakparov N.N. Molecular aspects of plant viruses' movement through plants // *Eurasian journal of applied biotechnology* - 2017. -Vol.2. -P. 1-10.
194. Gibbs A.J. Viruses and plasmodesmata. In: Gunning BES, Robards AW (eds) *Intercellular communication in plants: studies on plasmodesmata.* - New York: Springer, 1976. -P. 149–164.
195. Mérai Z., Kerényi Z., Kertész S., Magna M., Lakatos L., Silhavy D. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing // *J. Virol.* -2006. -Vol. 80. -P. 5747– 5756.
196. Mérai Z., Kerényi Z., Molnár A., Barta E., Válczi A., Bisztray G., Havelda Z., Burgián J., Silhavy D. Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity // *J. Virol.* - 2005. -Vol. 79. -P. 7217–7226.
197. Chiu M.H., Chen I.H., Baulcombe D.C., Tsai C.H. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway // *Mol Plant Pathol.* -2010. -Vol. 11. -P. 641-649.
198. Fagoaga C., Pensabene-Bellavia G., Moreno P., Navarro L., Flores R., Peña L. Ectopic expression of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus differentially modifies viral accumulation and tropism in two transgenic woody hosts // *Mol Plant Pathol.* -2011. -Vol. 12. -P. 898-910.
199. Ryabov E.V., Fraser G., Mayo M.A., Barker H., Taliansky M. Umbravirus gene expression helps potato leafroll virus to invade mesophyll tissues

and to be transmitted mechanically between plants // *Virology*. -2001. -Vol. 286. -P. 363–372.

200. Chen M.H., Citovsky V. Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase // *Plant J*. -2003. -Vol. 35. -P. 386–392.

201. Ueki S., Citovsky V. Cadmium ion-induced glycine-rich protein inhibits systemic movement of a tobamovirus // *Nat Cell Biol*. -2002. -Vol. 4. -P. 478–485.

202. Hull R. *Matthew's Plant Virology*. - Academic Press, 2002. - 895 p.

203. Waterhouse P.M., Wang M-B., Lough T. Gene silencing as an adaptive defense against viruses // *Nature*. -2001. -Vol. 411. -P. 834–842.

204. Vance V., Vaucheret H. RNA silencing in plants-defense and counterdefense // *Science*. -2001. -Vol. 292. -P. 2277–2280.

205. Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections // *Nature Rev. Genet*. -2005. -Vol. 6. -P. 206–220.

206. Lee W.S., Rudd J.J., Kanyuka K. Virus induced gene silencing (VIGS) for functional analysis of wheat genes involved in *Zymoseptoria tritici* susceptibility and resistance // *Fungal Genet Biol*. -2015. -Vol.79. -P. 84-88.

207. Goodin M.M., Zaitlin D., Naidu R.A., Lommel S.A. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions // *Mol. Plant-Microbe Interact*. -2008. -Vol. 21. -P. 1015–1026.

208. Kumagai M.H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K., Grill L.K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA // *Proc Natl Acad Sci USA*. -1995. -Vol. 92. -P. 1679–1683.

209. Peele C., Jordan C.V., Muangsan N., Turnage M., Egelkrout E., Eagle P., Hanley-Bowdoin L., Robertson D. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors // *Plant J*. -2001. -Vol. 27. -P. 357–366.

210. Liu Y., Schiff M., Marathe R., Dinesh-Kumar S.P. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus // *Plant J*. -2002b. -Vol. 30. -P. 415–429.

211. Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M., Baulcombe D.C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing // *Plant J*. -2001. -Vol. 25. -P. 237–245.

212. Lu R., Martin-Hernandez A.M., Peart J.R., Malcuit I., Baulcombe D.C. Virus induced gene silencing in plants // *Methods*. -2003a. -Vol. 30. -P. 296–303.

213. Robertson D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools // *Annu. Rev. Plant Biol*. -2004. -Vol. 55. -P. 495–519.

214. Burch-Smith T.M., Anderson J.C., Martin G.B., Dinesh-Kumar S.P. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants // *Plant J*. -2004. -Vol. 39. -P. 734–746.

215. Godge M.R., Purkayastha A., Dasgupta I., Kummar P.P. Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes // *Plant Cell Rep*. -2008. -Vol. 27. -P. 209–219.

216. Senthil-Kumar M., Anand A., Uppalapati S.R., Mysore K.S. Virus-induced gene silencing and its applications // *CAB Reviews: Perspectives in*

Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. -2009. -Vol. 11. -P. 1-18.

217. Unver T., Budak H. Virus-Induced Gene Silencing, a Post Transcriptional Gene Silencing Method // International Journal of Plant Genomics. -2009. -P. 1-8.

218. Zhang C., Yang C., Whitham S.A., Hill J.H. Development and use of an efficient DNA-based viral gene silencing vector for soybean // Mol. Plant Microbe Interact. -2009. -Vol. 22. -P. 123–231.

219. Purkayastha A., Dasgupta I. Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants // Plant Physiology and Biochemistry. -2009. -Vol. 47. -P. 967-976.

220. Gleba Y., Tusé D., Giritch A. Plant viral vectors for delivery by Agrobacterium // Current Topics in Microbiology and Immunology. -2014. -Vol. 375. -P. 155–192.

221. Folimonova S.Y., Robertson C.J., Shilts T., Folimonov A.S., Hilf M.E., Garnsey S.M., Dawson W.O. Strains of Citrus tristeza virus does not exclude superinfection by other strains of the virus // J Virol. -2010. -Vol. 84. -P. 1314–1325.

222. Yusibov V., Streatfield S.J., Kushnir N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond // Hum Vaccin. -2011. -Vol. 3. -P. 313-321.

223. Lico C., Chen Q., Santi L., Viral Vectors for Production of Recombinant Proteins in Plants // J. Cell. Physiol. -2008. -Vol. 216. -P. 366–377.

224. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants // Current Opinion in Biotechnology. -2007. -Vol. 18. -P. 134–141.

225. Paul D., Bartenschlager R. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories // World Journal of Virology. -2013. -Vol. 2. -P. 32–48.

226. Bendahmane M., Koo M., Karrer E., Beachy R. N. Display of epitopes on the surface of tobacco mosaic virus: impact of charge and isoelectric point of the epitope on virus-host interactions // J. Mol. Biol. -1999. -Vol. 290. -P. 9–20.

227. Jiang L., Li Q., Li M., Zhou Z., Wu L., Fan J. A modified TMVbased vector facilitates the expression of longer foreign epitopes in tobacco // Vaccine. -2006. -Vol. 24. -P. 109–115.

228. Uhde-Holzem K., Schlosser V., Viazov S., Fischer R., Commandeur U. Immunogenic properties of chimeric potato virus X particles displaying the hepatitis C virus hypervariable region I peptide R9 // J. Virol. Methods. -2010. -Vol. 166. -P. 12–20.

229. Zhang Y., Li J., Pu H., Jin J., Zhang X., Chen M. Development of Tobacco necrosis virus A as a vector for efficient and stable expression of FMDV VP1 peptides // Plant Biotechnol. -2010. -Vol. 8. -P. 506–523.

230. Chen T.H., Hu C.C., Liao J.T., Lee Y.L., Huang Y.W., Lin N.S., Lin Y.L., Hsu Y.H. Production of Japanese Encephalitis Virus Antigens in Plants Using Bamboo Mosaic Virus-Based Vector // Front Microbiol. -2017.- Vol. 7. -P. 1-12.

231. Azhakanandam K., Weissinger S.M., Nicholson J.S., Qu R., Weissinger A.K. Amplicon-plus targeting technology (APTT) for rapid production of a highly

unstable vaccine protein in tobacco plants // *Plant Mol Biol.* - 2007. -Vol. 63. -P. 393-404.

232. Shivprasad S., Pogue G.P., Lewandowski D.J., Hidalgo J., Donson J., Grill L.K., Dawson W.O. Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors // *Virology.* - 1999. -Vol. 255. -P. 312-323.

233. Kumagai M.H., Donson J., della-Cioppa G., Grill L.K. Rapid, high-level expression of glycosylated rice alpha-amylase in transfected plants by an RNA viral vector // *Gene.* - 2000. -Vol. 245. -P. 169-174.

234. Haviv S., Galiakparov N.N., Goszczynski D.E., Batuman O., Czosnek H., Mawassi M. Engineering the genome of Grapevine virus A into a vector for expression of proteins in herbaceous plants // *Journal of Virological Methods.* -2006. -Vol. 132. -P. 227-231.

235. Гриценко Д.А., Дерябина Н.Д., Галиакпаров Н.Н. Модификация генома вируса А винограда // *Eurasian journal of applied biotechnology.* – 2017. – Т. 4. – С. 17-25.

236. Gleba Y., Marillonnet S., Klimyuk V. Engineering viral expression vectors for plants: the ‘full virus’ and the ‘deconstructed virus’ strategies // *Curr. Opin. Plant Biol.* -2004. -Vol. 7. -P. 182-188.

237. Komarova T.V., Skulachev M.V., Zvereva A.S., Schwartz A.M., Dorokhov Y.L., Atabekov J.G. New viral vector for efficient production of target proteins in plants // *Biochemistry.* -2006. -Vol. 71. -P. 846-850.

238. Chen Q., He J., Phoolcharoen W., Mason H.S. Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants // *Hum Vaccin.* -2011. -Vol. 7. -P. 331-338.

239. Liu Z., Chen O., Wall J.B.J., Zheng M., Zhou Y., Wang L., Ruth Vaseghi H., Qian L., Liu J. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector // *Sci Rep.* -2017. -Vol. 7. -P. 1-9.

240. Ha S-H., Liang Y.S., Jung H., Ahn M-J., Suh S-C., Kweon S-J., Kim D-H., Kim Y-M., Kim J-K. Application of two bicistronic systems involving 2A and IRES sequences to the biosynthesis of carotenoids in rice endosperm // *Plant Biotechnology Journal.* -2010. -Vol. 8. -P. 928-938.

241. Marcos J.F., Beachy R.N. In vitro characterization of a cassette to accumulate multiple proteins through synthesis of a selfprocessing polypeptide // *Plant Mol. Biol.* -1994. -Vol. 24. -P. 495-503.

242. Ceriani M.F., Marcon J.F., Esteban Hopp H., Beachy R.N. Simultaneous accumulation of multiple virus coat proteins from a TEV-Nia based expression vector // *Plant. Mol. Biol.* -1998. -Vol. 36. -P. 239-248.

243. Mlynárová L., Loonen A., Mietkiewska E., Jansen R.C., Nap J. Assembly of two transgenes in an artificial chromatin domain gives highly coordinated expression in tobacco // *Genetics.* -2002. -Vol. 160. -P. 727-740.

244. Urwin P.E., McPherson M.J., Atkinson H.J. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs // *Planta.* -1998. -Vol. 204. -P. 472-479.

245. Dickmeis C., Fischer R., Commandeur U. Potato virus X-based expression vectors are stabilized for long-term production of proteins and larger inserts // *Biotechnol J.* -2014. - Vol. 9. -P. 1369-1379.
246. Vagner S., Galy B., Pyronnet S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites // *EMBO Rep.* -2001. -Vol. 2. - P. 893-898.
247. Jang S.K., Kräusslich H.G., Nicklin M.J., Duke G.M., Palmenberg A.C., Wimmer E. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation // *J Virol.* -1988. - Vol. 62. -P. 2636-2643.
248. Macejak D.G., Sarnow P. Translational regulation of the immunoglobulin heavy-chain binding protein mRNA // *Enzyme.* -1990. -Vol. 44. -P. 310-319.
249. Mlotshwa S., Voinnet O., Florian Mette M., Matzke M., Vaucheret H., Wei Ding S., Pruss G., Vance V.B. RNA Silencing and the Mobile Silencing Signal // *Plant Cell.* -2002. -Vol. 14. -P. 289–301.
250. Douin V., Bornes S., Creancier L., Rochaix P., Favre G., Prats A.C., Couderc B. Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors // *BMC Biotechnol.* -2004. -Vol. 4. -16 p.
251. Kozak M. Alternative ways to think about mRNA sequences and proteins that appear to promote internal initiation of translation // *Gene.* -2003. -Vol. 318. - P.1-23.
252. Roberts L.O., Seamons R.A., Belsham G.J. Recognition of picornavirus internal ribosome entry sites within cells; influence of cellular and viral proteins // *RNA.* -1998. -Vol. 4. -P. 520-529.
253. Kay M.A., Glorioso J.C., Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics // *Nat Med.* -2001. -Vol. 7. - P. 33-40.
254. Reynolds J.E., Kaminski A., Kettinen H.J., Grace K., Clarke B.E., Carroll A.R., Rowlands D.J., Jackson R.J. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation // *EMBO J.* -1995. -Vol. 14. -P. 6010-6020.
255. Wang Y., Wang F., Wang R., Zhao P., Xia Q. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori* // *Sci Rep.* -2015. -Vol. 5. -P. 1 - 10.
256. Ryan M.D., Donnelly M.L.L., Lewis A., Mehrotra A.P., Wilkie J., Gani, D. A model for Nonstoichiometric, Co-translational Protein Scission in Eukaryotic Ribosomes // *Bioorganic Chemistry.* -1999. -Vol. 27. -P. 55-79.
257. Donnelly M.L.L., Hughes L.E., Luke G.A., Mendoza H., ten Dam E., Gani D., Ryan, M.D. The “cleavage” activities of foot-and-mouth disease virus 2A sitedirected mutants and naturally occurring “2A-like” sequences // *Journal General Virology.* -2001b. -Vol. 82. -P. 1027-1041.
258. Doronina V.A., de Felipe P., Wu C., Sharma P., Sachs M.S., Ryan M.D., Brown J.D. Dissection of a co-translational nascent chain separation event // *Biochemical Society Transaction.* -2008a. -Vol. 36. -P. 712-716.

259. Szymczak A.L., Workman C.J., Wang Y., Vignali K.M., Dilioglou S., Vanin E.F., Vignali D.A. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector // *Nature Biotechnology*. -2004. -Vol. 22. -P. 589–594.
260. Luke G.A., de Felipe P., Lukashev A., Kallioinen S.E., Bruno E.A., Ryan M.D. Occurrence, function and evolutionary origins of '2A-like' sequences in virus genomes // *Journal of General Virology*. -2008. -Vol. 89. -P. 1036–1042.
261. Trichas G., Begbie J., Srinivas S. Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice // *BioMed Central BMC Biology*. -2008. -Vol. 6. - 40 p.
262. Torres V., Barra L., Garcés F., Ordenes K., Leal-Ortiz S., Garner C.C., Fernandez F., Zamorano P. A bicistronic lentiviral vector based on the 1D/2A sequence of foot-and-mouth disease virus expresses proteins stoichiometrically // *Journal of Biotechnology*. -2010. -Vol. 146. - P.138-142.
263. François I.E.J.A., De Bolle M.F.C., Dwyer G., Goderis I.J.W.M., Verhaert P., Proost P., Schaaper W.M.M., Cammue B.P.A., Broekaert W.F. Transgenic expression in *Arabidopsis* of a polyprotein construct leading to production of two different antimicrobial proteins // *Plant Physiology*. -2002. -Vol. 128. -P. 1346-1358.
264. François I.E., van Hemelrijck W., Aerts A.M., Wouters P.F.J., Proost P., Broekaert W.F., Cammue B.P.A. Processing in *Arabidopsis thaliana* of a heterologous polyprotein resulting in differential targeting of the individual plant defensins // *Plant Science*. -2004. -Vol. 166. -P. 113-121.
265. de Felipe P., Luke G.A., Brown J.D., Ryan M.D. Inhibition of 2A-mediated 'Cleavage' of Certain Artificial Polyproteins Bearing N-terminal Signal Sequences // *Biotechnology Journal*. -2010. -Vol. 5. -P. 213-223.
266. Pogue G.P., Vojdani F., Palmer K.E., Hiatt E., Hume S., Phelps J., Long L., Bohorova N., Kim D., Pauly M., Velasco J., Whaley K., Zeitlin L., Garger S.J., White E., Bai Y., Haydon H., Bratcher B. Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems // *Plant Biotechnol J*. - 2010. -Vol. 8. -P. 638-654.
267. Popescu S.C., Popescu G.V., Bachan S., Zhang Z., Seay M., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S.P. Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2007. -Vol. 104. -P. 4730-4735.
268. McCormick A.A., Reinl S.J., Cameron T.I., Vojdani F., Fronefield M., Levy R., Tuse D. Individualized human scFv vaccines produced in plants: Humoral anti-idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig // *J Immunol Methods*. -2003. -Vol. 278. -P. 95–104.
269. Monger W., Alamillo J.M., Sola I., Perrin Y., Bestagno M., Burrone O.R., Sabella P., Plana-Duran J., Enjuanes L., Garcia J.A., Lomonossoff G.P. An antibody derivative expressed from viral vectors passively immunizes pigs against transmissible gastroenteritis virus infection when supplied orally in crude plant extracts // *Plant Biotechnol J*. -2006. -Vol. 4. -P. 623–631.
270. Castilho A., Bohorova N., Grass J., Bohorov O., Zeitlin L., Whaley K., Altmann F., Steinkellner H. Rapid high yield production of different glycoforms of Ebola virus monoclonal antibody // *PLoS One*. -2011. -Vol. 6. -P. 1-10.

271. Yang S.J., Carter S.A., Cole A.B., Cheng N.H., Nelson R.S. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2004. -Vol. 101. -P. 6297-6302.
272. Twyman R.M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology // *Trends Biotechnol*. - 2003. -Vol. 21. -P. 570-578.
273. Schahs M., Strasser R., Stadlmann J. et al. Production of a monoclonal antibody in plants with a humanized N-glycosylation pattern // *Plant Biotech J*. - 2007. -Vol. 5. -P. 657–663.
274. Strasser R., Stadlmann J., Schahs M. et al. Generation of glyco-engineered *nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure // *Plant Biotech J*. -2008. -Vol. 6. -P. 392–402.
275. Strasser R., Castilho A., Stadlmann J. et al. Improved virus neutralization by plant-produced anti-HIV antibodies with a homogeneous beta1,4-galactosylated N-glycan profile // *J Biol Chem*. -2009. -Vol. 284. -P. 20479–20485.
276. Castilho A., Bohorova N., Grass J., Bohorov O., Zeitlin L., Whaley K., Altmann F., Steinkellner H. Rapid high yield production of different glycoforms of ebola virus monoclonal antibody // *PLoS One*. -2011. -Vol. 6. -P. 1-10.
277. Whaley K.J., Hiatt A., Zeitlin A. Emerging antibody products and *nicotiana* manufacturing // *Hum Vaccines*. -2011. -Vol. 7. -P. 349–356.
278. Phoolcharoen W., Bhoo S.H., Lai H., Ma J., Arntzen C.J., Chen Q., Mason H.S. . Expression of an immunogenic ebola immune complex in *nicotiana benthamiana* // *Plant Biotech J*. -2011a. -Vol. 9. -P. 807–816.
279. Hudziak R.M. et al. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor // *Mol Cell Biol*. -1989. -Vol. 3. -P. 1165–1172.
280. Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer // *N Engl J Med*. -2005. -Vol. 353. -P. 1659–1672.
281. Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 // *N Engl J Med*. -2001. -Vol. 344. -P.783–792.
282. Smith I., Procter M., Gelber R.D. et al. Two year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomized controlled trial // *Lancet*. -2007. -Vol. 369. -P. 29–36.
283. Capodicasa C., Chiani P., Bromuro C. et al. Plant production of anti-glucan antibodies for immunotherapy of fungal infections in humans // *Plant Biotech J*. -2011. -Vol. 9. -P. 776–787.
284. Lai H., Engle M., Fuchs A. et al. Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats west nile virus infection in mice // *PNAS*. -2010. -Vol. 107. -P. 2419–2424.

285. Pniewski T., Kapusta J., Bociag P. et al. Plant expression, lyophilisation and storage of HBV medium and large surface antigens for a prototype oral vaccine formulation // *Plant Cell Rep.* -2012. -Vol. 31. -P. 585–595.
286. Pniewski T., Kapusta J., Bociag P. et al. Low-dose oral immunization with lyophilized tissue of herbicide-resistant lettuce expressing hepatitis B surface antigen for prototype plant-derived vaccine tablet formulation // *J. Appl. Genet.* -2011. -Vol. 52. -P. 125–136.
287. Buonaguro F.M., Tornesello M.L., Buonaguro L. Virus-like particle vaccines and adjuvants: the HPV paradigm // *Expert Rev. Vaccines.* -2009. -Vol. 8. -P. 1379–1398.
288. Herbst-Kralovetz M., Mason H.S., Chen Q. Norwalk virus-like particles as vaccines // *Expert Rev. Vaccines.* -2010. -Vol. 9. -P. 299–307.
289. Peixoto C., Sousa M.F., Silva A.C., Carrondo M.J., Alves P.M. Downstream processing of triple layered rotavirus like particles // *J. Biotechnol.* -2007. -Vol. 127. -P. 452–461.
290. Scotti N., Alagna F., Ferraiolo E. et al. High-level expression of the HIV-1 Pr55gag polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts // *Planta.* -2009. -Vol. 229. -P. 1109–1122.
291. Schwach F., Vaistij F.E., Jones L., Baulcombe D.C. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal // *Plant Physiol.* -2005. -Vol. 138. -P. 1842–1852.
292. Mlotshwa S., Pruss G.J., Vance V. Small RNAs in viral infection and host defense // *Trends Plant Sci.* -2008. -Vol. 13. -P. 375–382.
293. Moore C.J., Sutherland P.W., Forster R.L., Gardner R.C., MacDiarmid R.M. Dark green islands in plant virus infection are the result of posttranscriptional gene silencing // *Mol Plant Microbe Interact.* -2001. -Vol. 14. -P. 939–946.
294. Bagasra O., Prilliman K.R. RNA interference: the molecular immune system // *J. Mol. Histol.* -2004. -Vol. 35. -P. 545–553.
295. Navarro L., Dunoyer P., Jay F., Arnold B., Dharmasiri N., Estelle M., Voinnet O., Jones J.D. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling // *Science.* -2006. -Vol. 312. -P. 436–439.
296. Grishok A. RNAi mechanisms in *caenorhabditis elegans* // *FEBS Lett.* -2005. -Vol. 579. -P. 5932–5939.
297. Fulci V., Macino G. Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa* // *Curr Opin Microbiol.* -2007. -Vol. 10. -P. 199–203.
298. Brodersen P., Voinnet O. The diversity of RNA silencing pathways in plants // *Trends Genet.* -2006. -Vol. 22. -P. 268–280.
299. Robertson D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools // *Annu Rev Plant Biol.* -2004. -Vol. 55. -P. 495–519.
300. Faivre-Rampant O., Gilroy E.M., Hrubikova K., Hein I., Millam S., Loake G.J., Birch P., Taylor M., Lacomme C. Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato // *Plant Physiol.* -2004. -Vol. 134. -P. 1308–1316.

301. Becker A., Lange M. VIGS-genomics goes functional // Trends Plant Sci. -2010. -Vol.15. -P.1-4.
302. Himber C., Dunoyer P., Moissiard G., Ritzenthaler C., Voinnet O. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing // EMBO J. -2003. -Vol. 22. -P. 4523–4533.
303. Bruun-Rasmussen M., Madsen C.T., Jessing S., Albrechtsen M. Stability of Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in barley // Mol Plant Microbe Interact. -2007. -Vol. 20. -P.1323–1331.
304. Thomas C.L., Jones L., Baulcombe D.C., Maule A.J. Size constraints for targeting posttranscriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector // Plant J. -2001. -Vol. 25. -P. 417–425.
305. Burch-Smith T.M., Anderson J.C., Martin G.B., Dinesh-Kumar S.P. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants // Plant J. -2004. -Vol. 39. -P.734–746.
306. Lacomme C., Hrubikova K., Hein I. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats // Plant J. -2003. -Vol. 34. -P. 543–553.
307. Hein I., Barciszewska-Pacak M., Hrubikova K., Williamson S., Dinesen M., Soenderby I.E., Sundar S., Jarmolowski A., Shirasu K., Lacomme C. Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley // Plant Physiol. -2005. -Vol. 138. -P. 2155–2164.
308. Pflieger S., Blanchet S., Camborde L., Drugeon G., Rousseau A., Noizet M., Planchais S., Jupin I. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis* using a ‘one-step’ TYMV-derived vector // Plant J. -2008. -Vol. 56. -P. 678–690.
309. Molnár A., Csorba T., Lakatos L., Várallyay E., Lacomme C., Burgyán J. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs // J Virol. -2005. -Vol. 79. -P. 7812–7818.
310. Choi H.W., Hwang B.K. The pepper extracellular peroxidase CaPO2 is required for salt, drought and oxidative stress tolerance as well as resistance to fungal pathogens // Planta. - 2012. -Vol. 235. P.1369-1378.
311. Lee S.C., Choi D.S., Hwang I.S., Hwang B.K. The pepper oxidoreductase CaOXR1 interacts with the transcription factor CaRAV1 and is required for salt and osmotic stress tolerance // Plant Mol Biol. - 2010. -Vol. 73. -P. 409-424.
312. Wilson P.B., Estavillo G.M., Field K.J., Pornsiriwong W., Carroll A.J., Howell K.A., Woo N.S., Lake J.A., Smith S.M., Harvey Millar A., von Caemmerer S., Pogson B.J. The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in *Arabidopsis* // Plant J. - 2009. -Vol. 58. -P. 299-317.
313. Guo Y., Huang C., Xie Y., Song F., Zhou X. A tomato glutaredoxin gene SGRX1 regulates plant responses to oxidative, drought and salt stresses // Planta. - 2010. -Vol. 232, №6. -P.1499-1509.
314. Yuan-Ge W., Xue H., Wen-Ying M., Zhao X.-Q., Bin L., Yi-Ping T. Wheat PROTON GRADIENT REGULATION 5 is involved in tolerance to photoinhibition // J. Int. Agric. -2014.- Vol. 13. -P. 1206–1215.

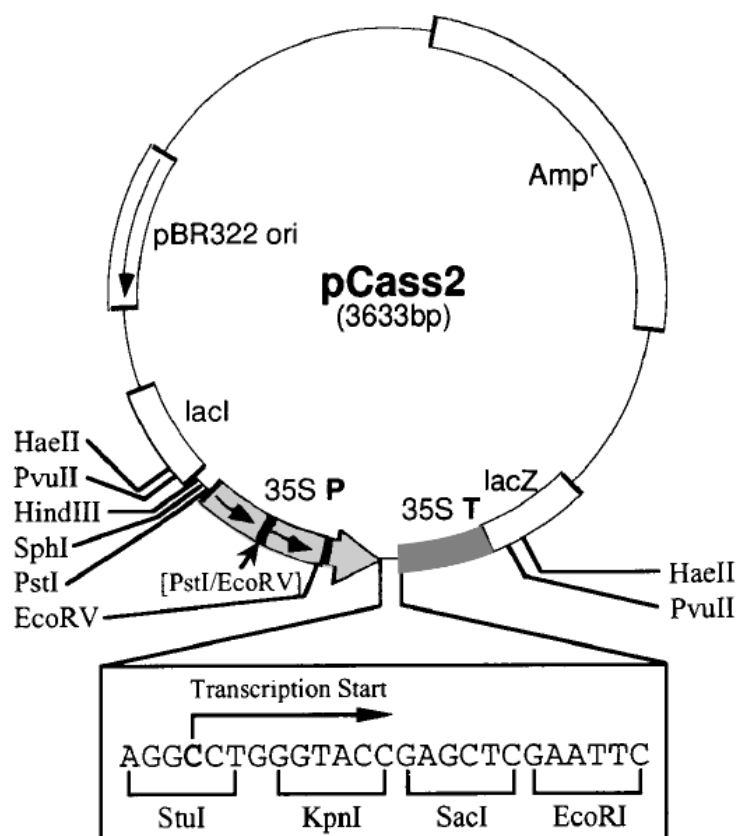
315. Atwood S.E., O'Rourke J.A., Peiffer G.A., Yin T., Majumder M., Zhang C., et al. Replication protein A subunit 3 and the iron efficiency response in soybean // *Plant Cell Environ.* -2014. -Vol. 37. -P. 213–234
316. Lange M., Yellina A.L., Orashakova S., Becker A. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems // *Methods Mol Biol.* - 2013. -Vol. 975. -P. 1-14.
317. Plotkin S.A. Vaccines: past, present and future // *Nat Med.* -2005. -Vol. 11. -P. 5–11.
318. Boraschi D., Del Giudice G., Dutel C et al. Ageing and immunity: addressing immune senescence to ensure healthy ageing // *Vaccine.* -2010. -Vol. 28. -P. 3627–3631
319. Hefferon K. Repurposing Plant Virus Nanoparticles // *Vaccines (Basel).* - 2018. - Vol. 6. -11 p.
320. Turpen T.H., Reinl S.J., Charoenvit Y., Hoffman S.L., Fallarme V., Grill L.K. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus // *Bio/technology.* -1995. -Vol. 13. -P. 53-57.
321. Porta C., Lomonossoff G.P. Scope for using plant viruses to present epitopes from animal pathogens // *Rev Med Virol.* -1998. -Vol.8. -P. 25-41.
322. Sánchez F., Sáez M., Lunello P., Ponz F. Plant viral elongated nanoparticles modified for log-increases of foreign peptide immunogenicity and specific antibody detection // *J. Biotechnol.*-2013. -Vol. 168. -P. 409-415.
323. O'Brien G.J., Bryant C.J., Voogd C., Greenberg H.B., Gardner R.C., Bellamy A.R. Rotavirus VP6 expressed by PVX vector in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembler into virus-like particles // *Virology.* -2000. -Vol. 270. -P. 444- 453.
324. Marconi G., Albertini E., Barone P., De Marchis F., Lico C., Marusic C., Rutili D., Veronesi F., Porceddu A. In planta production of two peptides of the Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of potato virus X // *BMC Biotechnol.* -2006. -Vol. 6. - 29 p.
325. Lico C., Mancini C., Italiani P., Betti C., Boraschi D., Benvenuto E., Baschieri S. Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8⁺ T cells in mice // *Vaccine.* -2009. -Vol. 27. -P. 5069-5076.
326. Uhde-Holzem K., Schlösser V., Viazov S., Fischer R., Commandeur U. Immunogenic properties of chimeric potato virus X particles displaying the hepatitis C virus hypervariable region I peptide R9 // *J. Virol. Methods.* -2010. -Vol. 166. -P. 12-20.
327. Uhde-Holzem K., Fischer R., Commandeur U. Genetic stability of recombinant potato virus X virus vectors presenting foreign epitopes // *Arch. Virol.* -2007. -Vol. 152. -P. 805-811.
328. Cerovska N., Hoffmeisterova H., Moravec T., Plchova H., Folwarczna J., Synkova H., Ryslava H., Ludvikova V., Smahel M. Transient expression of Human papillomavirus type 16 L2 epitope fused to N- and C-terminus of coat protein of Potato virus X in plants // *J. Biosci.* - 2012. -Vol. 37. -P. 125-133.
329. Galiakparov N., Tanne E., Sela I., Gafny R. Functional analysis of the grapevine virus A genome // *Virology.* -2003. -Vol. 306. - P.42-50.
330. 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 // *J Vis Exp.* -2013. -Vol. 77. -P. 1-9.
331. He S. Northern blot // *Methods Enzymol.* -2013. Vol. 530. -P. 75–87.

332. Mahmood T., Yang P. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting // N Am J Med Sci. -2012. -Vol. 4, № 9. -P.429–434.
333. Fisher D., Guiltinan M. Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: A seed-to-seed protocol // Plant Molecular Biology Reporter. - 1995. - Vol. 13. -P. 278 -289.
334. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol Biol Evol. -1987. -Vol. 4, № 4. -P. 406-425.
335. Froger A., Hall J. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method // J Vis Exp. -2007/ -Vol. 6. - 253 p.
336. Wise A.A., Liu Z., Binns A.N. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium* // Methods Mol Biol. –2006. – Vol. 343. – P.43-53.
337. Rubinson E., Galiakparov N., Radian S., Sela I., Tanne E., Gafny R. Serological detection of grapevine virus A using antiserum to a nonstructural protein, the putative movement protein // Phytopathology/ -1997.- Vol. 87. -P. 1041-1045.
338. Gritsenko D.A., Galiakparov N.N. Insertion of 2a ‘self-cleaving’ peptides between orf4 and orf5 of grapevine virus a genome for vector development // Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc. -2017. -Vol.19, № 4. -P. 1034-1040.
339. Гриценко Д.А., Галиакпаров Н.Н. Клонирование и секвенирование нуклеотидных последовательностей саморазрезающихся Т2А и Е2А пептидов // II Конференция «Международные Фарабиевские чтения». - Алматы, 2015. -С. 145 -146.
340. Lacks S., Greenberg B. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation // J. Mol. Biol. -1997. -Vol.114. - P. 153-168.
341. Gritsenko D.A., Kenzhebekova R.T., Deryabina N.D. Designing of the cloning vector for PCR- products // Конференция «IV Международные Фарабиевские чтения». - Алматы, 2017. -71 с.
342. Гриценко Д.А., Кенжебекова Р.Т., Галиакпаров Н.Н. Создание Т-вектора для прямого клонирования ПЦР-продуктов // Eurasian journal of applied biotechnology. – 2016. – Т. 4. – С. 43-50.
343. Zakiryanova G., Karpova O., Khamdiyeva O., Kopytina D., Urazalieva N., Kustova E., Biyasheva Z. C-kit/SCF autocrine loop in human NK cells // Journal of Immunology. -2014. -Vol. 192. - 8 p.
344. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Gritsenko D.A., Omasheva M.Y., Galiakparov N.N., Reed B.M., Kushnarenko S.V. Cryotherapy as a method for reducing the virus infection of apples (*Malus* sp.) // Cryo Letters. – 2016. – Vol.37, No. 1. – P. 1-9.
345. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Kopytina D.A., Kassenova A.M., Omasheva M.Y., Galiakparov N.N., Kushnarenko S.V. Detection of viruses in various *Malus* varieties, clonal rootstocks and wild forms, in vitro micropropagated to create a cryogenic apple bank // First GGBN International Conference on Biodiversity Biobanking. - London, 2014. -25 p.

346. Kopytina D.A., Galiakparov N.N. Cloning of Grapevine virus A genome into binary vector and investigation its infectious activity // Конференция «Plant biology and biotechnology. International conference». -Алматы, 2014. -206 с.
347. Копытина Д.А., Галиакпаров Н.Н. Изучение способности вируса А винограда инфицировать *Nicotiana Benthamiana* при агробактериальной инфильтрации // KazNU Bulletin. Biology series. - 2014. - Vol.60, №1. -195 -199.
348. Ерболова Л.С., Копытина Д.А., Касенова А.М., Рябушкина Н.А., Кампитова Г.А., Олейченко С.Н., Галиакпаров Н.Н. Адаптация безвирусного посадочного материала винограда *Vitis vinifera* L. cv. *Saperavi*, полученного *in vitro* к условиям *ex vitro* // Вестник Национальной Академии НАН РК. -2013. - № 5. -С. 72 - 80.
349. Gritsenko D.A., Deryabina N.D., Galiakparov N.N. Development of “deconstructed virus” vector based on grapevine virus A // 3rd Global Summit on «Plant Science». - Italy, 2017. -109 p.
350. Гриценко Д.А., Кенжебекова Р.Т., Галиакпаров Н.Н. Регенерация трансгенных *Nicotiana benthamiana* несущих гены капсидного и транспортного белков вируса А винограда // II Международный конгресс «Глобальные изменения климата и биоразнообразия».- Алматы, 2015. -320 с.
351. López Puga J., Krzywinski M., Altman N. POINTS OF SIGNIFICANCE: Bayesian statistics // Nat Methods.- 2015. - Vol.12. - P. 377-8.
352. Lewandowski, D.J., Dawson, W.O. Deletion of internal sequences results in tobacco mosaic virus defective RNAs that accumulate to high levels without interfering with replication of the helper virus // Virology. -1998. -Vol. 251. -P. 427–437.
353. Gritsenko D.A., Galiakparov N.N. Insertion of 2A peptides between ORF4 and ORF5 of Grapevine virus A // 4th International conference «Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology». - Almaty, 2017. -158 p.
354. Gritsenko D.A., Kenzhebekova R.T., Galiakparov N.N. Investigation of Developed “Full Viral” vector based on GVA genome for reporter gene expression // International conference «Smart Bio». - Lithuania, 2017. -46 с.
355. Gritsenko D.A., Deryabina N.D., Galiakparov N.N. Modification of Grapevine virus A genome for vector development // International virology conference. - Canada, 2017. -40 p.
356. Gritsenko D.A., Deryabina N.D., Galiakparov N.N. Expression of mutant form of eGFP in viral vector // V international Farabi readings. - Almaty, 2018. -150 p.
357. Taylor S.C., Berkelman T., Yadav G., Hammond M. A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data // Mol Biotechnol. - 2013. -Vol. 55, № 3. -P. 217-226.
358. Gritsenko, D.A., Kenzhebekova, R.T., Deryabina, N.D., Galiakparov N.N. Development of a “deconstructed” vector based on the genome of grapevine virus A // Plant Biotechnol Rep. -2019. - Vol. 13. - P. 169-177.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Схематическое изображение pCass2 вектора



ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 - Нуклеотидная последовательность изолята РА-3 вируса А винограда

ОРС	Нуклеотидная последовательность (5' - 3')
ОРС1	ATGTCAATATCAGTATCCTCCCAACGTGTAGCAGTTTCCAACCTCTACACTAA CGGATCTGAAGAATCAGTTAAAGCCATAAAGGAGTTAAAGAGCAAACGGTTA TTGGAAACCGAAACCAGGTTAGATGGGCTTTTTGATTACTACATCCCAGACAC CTTGAGAGAAATACTCTCTGGTTATGGTATGGAGTTCTCAGTCCACTCTTTCC AGGGGCACGCTCACCCCGTAAGTAAAATGATTGAGAATCATATGCTGTATAG AGTAGCGCCGAACATAATTTTCTAACAATACCCTTGTAGTTAGCTGTAAAGAAG GAAAAATCAAGCGCCTAAGATTAAAGAACGCAGGTAATAGGAATTTGAACTT CACACAATACAATAGATTGGTACACGCCAAGGATCATCACAGATACGAGAAT GCGTTCAGAGAGCTAGACGTTGGCAATCTGACAAATCTCATAAACAAGGAAT CCCAAAGCGAGTGCATCTTCATTCATGACGAAGTTCAATATTGGAGCCTAGAC GAAATGCAGAGATTCTTAGGTAGCTTGTCTAAGGTAGATAGAATAGTGTACA GCATCATATACCCAGCGGAGGTAGAAGCGGGGTATTCACAGAGCCTGTTCCC CGAGGCATATACTTTTGATTTAAAAGAGGGGAGGCTCATATGGTACCCTGAT GGTAAGGCCGAGGGCGCCTACACTCAGCCAATCAACCCTTGGCTATTAAGGT GCTCAAAAACCGAGGACTCCAAAGGCAGGTCATGGACTATAACCAAATTGCA AACTGTTGGGGCTCACACCTCTTTAGTGCAATAAGGGGAAGTTATCTGACGG AGGAATCATACAAATATGATAACTTCACGATAATCAACCCCAATGATATCCT GAGAGGGAGGAGAGGGAGCAAGCCGCTATACTTGAGAGCCCGTATGATAAA GCCCACACTGCTATATCTCCTGGCACTAAAGAAGAGTGACTCGAACTCTGCG GTGGCCAAGCTGCGAATGCTGAGCAGCCGCGAAGAGAACATGGACGAGGCA CTATTCGTGGCTCAACTGGCGAAGCAAATCAGGGACACAGCGCTCTATGACA AGATGGGCAATCCAAGTCTGCGGAGCATACTGTCCGAATCATTCTACGATGT GGCCGGAAATCTGTTCACTAGATTGTTCAACAGGCCAGAATACGATGCCAGG TGCTTGAGAGAAGTTCATCAGGGCCTGCGAAACCACAGAGATACACATCGGCA GAAGGTTTCATGGAGGGGGTGCTACGGGGCTCCAGTTATCAGGTTTCAGAAAGT AGTAGATTGGGTTGAGGACGAAGAGGCCAACGCGCTGAGTGAGGTCAATCTT GTTGAACTCACGAGAAATGAAAGAGAGCCACAGCCATACGGATCAGAGCAA TTGCAAGGGTCAGGTGCTAGGGTGAGGTTCCCTTTGAGTCGGCTAATGAGGG CGCACGAAATGGTGCATGAGGCTCAGTTCGAGGTCAACTTTAATCACATCAG AATAGTGTGCTCCTCTAAAGCCCTGGTGCCTTAAGGCAATACCTGATCAGAC TGGGCAGGTTCAAATTCATGGAAGGCAGAGCAATAGAGGACATACAAGACAT TCAAGAGGGGGCTTGAAGTGGGCCTGATCACAGAAGAAGAGGCTGAATCACGC CTGCTACCACCGGACAACATCGCACCCAGCGAAGAAGCCCAAGAAGAGGTGC AGCAAAGCGGTCCCATTGAAGAGGTGAGTGAAAAGTTCATGGGGGCACGCA AATTGGTTAAGGAGAACATTTACTCTGAAAACTGCACAACAGAGAGGTGGC CTTCTACAGCCGGTACAGCAAGCAGTACAGTTACAAAGGGGGCTCACACCAC TCACTCGGATGGGATAAAGCTTTGGATGAGCTCATACAAGAGTTGGGCCTAG ATGAGAGCTATGACCACTGTCTCATTCAACGGTACTCTGAGGGTGGCAGTATC AATTTCCACGCCGATGATGAGCCCTGCTATCTACCAGGAGGAACCGTGGTGA CGGTGAATTTGAATGGGGAAGCAATCTTTGAGTTGAAGGAGAACACATCAGG CAAAACCGAGTCAAAAAGATTAAAGGATGGTGATGTGTTACAATGGGCGCA GGAATGCAGCAAACCCATAAACACAAGGTCACCTCACTCACTAACGGGCGAT GTAGTATCACTCTGAGGAACAAGACAGTGGACTACGAGGCAAGGACGGAGG CAATCAATTCCGATTACGAGGAGGATGTAGCAGCACTGGACGAGGGAATTGA GTACCTCCAAAAGAATCAAGGGAATATGTGCTCCCTGAAGGCTTTTGCTGAA

Продолжение таблицы Б.1

ОРС	Нуклеотидная последовательность (5' - 3')
	CACATGCAATTGAGCATAACCAAGCGTGATCTCAATAGTAAATGGCGCATCGC CACAAACACTGAGAGAAATAGAAGGTGGTGGGATCAGTGTGCGGACGCTTGT GAATCTCTCGAGGGCGCTGGACTTCCCGATCGCCATTCACGGAGAGAGAGGA TATGCTGAAACGCCTGGAACATATAGAAGACTGCACCTCAAGATCACAAACAG GGCACGTGGAACCATTTCGATGGAGTCATAAGTAAGGGCGGTCTTAAGGAGGC CCTGTTGCTGAGCGATGGCGTTGGAATAGGTCTATTTCAGAGTGGACAAAAAT AAGGCTGACCGCCTTGCCCAAAGTTTCTACAACGGGAACACAGGGGTGCTTC TGGGAAAGTACAATAAAGGCAAGATGCACTCAGAGGGCATAGATGAACCAA AGGAGGTGCTCACCGCTTTCGGATTTGCAGGTTTCAGGGAAAAGTCACTGGTG TCAAACCATACTTAAACACTGTTCCGTAGAGAAAGCCCTCGTTATCAGCCAC GGAAGGTACTCAAAGACGACTGGACCTCAAAGATCTCAAAGAGGCACAAAG TGGTGACATTTCGAGGTGGCTTTCATGGATGATTATGGCTGCAAGGATGTGGTT ATCGACGAGATCGGGTTGCTACCTCCTGGGTACATCGATTTAGTCATTGCTGT GCATAGACCACGTACACTGGTGCTCCTGGGGGATCCACTGCAAAGCACCTAC CACAGCAAGCGTGACAACGTAGTCTTGGAGGCCAGTCAAGAGGACATCTTTG CCAGGATCAAAGGGCAGCTACCATACTCTGCTACTCCCACCGGCTCCCAA GAATTGCAGATTATTCGAGCTAGAGTGCATGGGAGCGGAGAGCGAAAAGAG GGTAACCTATCGCTCGAGTCGCCTCAAGGACGAGCCGGTCATCTGCGCGACC AGGGCCATGAAGGAGGAAAAAGGGTCAGGCTGGTACACAGTGAGCGAGACC CAAGGGCTAAGCTTCAAATCGTGTCTCATTACCTTGATGAGCATTGGGCGAA GAAAGAGGATGAGGATGTGATGGTGGCCCTGACAAGATCAAGAGGGGAAAT AGGCATAAACGTCACCAATGCACTCAAGAAGACGTTGATCGCGAGCGCAAAA AGTACGCTGCTCAGGAAGGTACTCAAGGGGGAGACATATAGGCGTTCTGAAA TCGTTGCCATGGCCCGCAAGCATATACCAGAAGTCACCGTTCTCTTCGAGGAG AGTAGGCTAGCAGAAAATGTGGATTATGAAGCTAGGTTAGCTGGTGATCCAT ACTTGAAGTCACTGCTCTCACTCTATGATGAGATTGAAATGGACGAGGTGGA AATTGAAGAACCGGTCGCTCTGGAACCGGTTAAAACCCATCTCGCATTGAGT GAGAAGATGAACGAACTGGCCCCTTTCGAATTGAAGGCCAAAGAGTACAGAG AGCAGTACACGGATGCTGGAAGGACTGAGCAGATAGACGAGGAGGGGTATA GCGGGGAAGAGGCCAATCCGATGACCCACAAGGCTTTGTACCTAAAACACAC CTCTGATGACACTGCCACGTTTATGATGTCTGTAAGGAAGCGATTGCGCTTCA GAAACTATGAGGCAAACAGAAGGAAGTCCAAGGCATGTAATGGCATCGGAA AGCAGATGTTCTCGGTCTTCAAGGAGACATAACCAGTTGAAGGAGATCGATTC CTTACCCGATCTGGAGAGGTGCGAAATGGAATTCATGAAGAAACGCGTGAG AAGAGCGCGGGTCTAATAGAGCAGCATGCCGGGCGTAGTGACCCAGACTGGC CAAGCAACTACCTGAAGATCTTCTGAAACAGCAGACCTGTACAAAAATGGA GAAACGCGGCGTGGAACGCAAAGGCGGGTCAAACCATAGCCTGCTTCGCCCCAC TCCGTGCTTTGTAGATTTCGGCCCTATACTCAGACAGACAGAAAGGGCACTCA GGGAATTGTTACCGGAGAATGTAATGATATACTCTCAGAAGAACTACATGGA CCTGGACAAATGGGCCAAGACCTGGGTGAGAGCATGATGGGGACGGATTCC GATTATGAGGCCTTTGATCGATCTCAAGATGAGAAAGTGCTAGATCTAGAGG TAGAAGTGCTTCGCTTCTTCTATGGCCGGAGGATTTAATCAGGGAGTACGAG GAGCTTAAACTGATGATGGGGTGCGCACTGGGTGATCTAGCCGTGATGCGGT TTTCGGGCGAGTTCGGGACATTCTTCTTCAACACCATATGCAACATGGTATTT AGCTGCATGCGCTATCATATGGATCGCAACACCCCAATATGTTTTCGCTGGGGA TGACATGTATTCACCTGGGATCCTGAGGACAAAGAATGATTATGAGGGGACT CTAGACCAACTGACTCTGAAAGCGAAAGTGCATATATCTGAAGAGCCATTGT TCTGTGGTTGGAGGATGAGCCCCCTTCGGGATAGTGAAGGAGCCCAATCTAAT CCTGGATCGCTGGAAGATCGCGAAAAGAAGTGGAATCTGTCACTCTGTCTC GTCAACTACGCGATTGAGGCTAGTTTTGGGTACAGGTTAAGCGAGTACCTGT

Продолжение таблицы Б.1

ОПС	Нуклеотидная последовательность (5' - 3')
	ATGATGTTAATATAGACGTCGATGCTCAGCAAGAACTGATAAGGGAGATTGT GGAAAAGAAGCACCTACTGCCGAAAAAGATAGCAGATCTTTTCAGTGAGGAC GAGTGCAGAGGCGCACAGCGATGGCGACGAGGACTTTTTGAGTAATGACATCG CAAAGTTGTACAGAGTTGGTTGA
ОПС2	ATGACATCGCAAAGTTGTACAGAGTTGGTTGAGTTCTTGAGTCAGGGTGGTG ATAGGTGCAGTTTATAGATAGAACGTCACCTTGAGTCCTTGTCGTATACACAGTGT CTGTACTTATTGTCTGATCTTAGAGGCCTAGGATATCACAGTATAGATAGCAT ATTACATATACTGGAGTGTAGCGAGGCGGAACGTTTCGAAATCTATCGAATCT TCCGGAGGCACGGAATCGGGATTGGAGAGGCTTTGCAGCTAGGCGTGAGAAA AAGTTTGTGTTACAGTCCGAGAAGCACCGCAGAGATACTGGACGACCTCCTG TCCAGGATAAGCAGGGGAGGTGCCTTCCTACCAAGTGATCTGGGTGCAGTGA AAGGAGAACTTCTGGTTACATTCCAACCGTCCAGATTAAGTGATAGACCTCTAC GCTAATAACCAAGAAGGTGTGTACCAGGACGTGTCAAGGCAAAGGCGACGCA GGTTATGTGCGCACGGAGATTCTCAGGCTACAAAGGGCTCGCTCTCAGATCCCA AGGAAATTAA
ОПС3	ATGTCGCACGGAGATTCTCAGGCTACAAAGGGCTCGCTCTCAGATCCCAAGG AAATTAAGATATTCAATGTCAAGAGAAACACAAAGGATCTCGAGACACTGAA CAAGAGCCTCCACAGGGGAGATGTGTACGACACGGAGCTAATAGAGCGTGTG TTTCCAAGACGCACAAAGAAATGCGTCGTGCACAAGGAGCTAGTCGTTCAAG ATGGCCGAGTGGATTGCGAGCTGGATCTGATGGACGGGGGTTTGGATGATAT AGATGAGACAGAATACCCGCTCTACCACGTGGGGTGTATCGTCATCGCTTTAA TGCCACATGGTAAGAATCTCCAGGGCAAGGTGGTTGTGCGAGGTGATAGATAC CCGGCTCAAGGTTGGGTCAGGGCGGATCTCTAGGAGCGTGATGGATATGTGCG AAACCCTTAAGCGCATGTGCCGACTTCCCGGGGTACTTCATTAGTACTTCCGA TCTGTTGAACGGATACACGCTGCACCTCTCCATAACCACAACCTGATCTGCAGT TTGTGGACGGCGTGCACCCATTACGCGTACAACCTCATGAATATCGGGCGTCTC TGCGGGGATGACATGAAGACAAGGTATGCGGTAGGAGAGGCCTCGAAGATC CTGCATCAGAACATCCTAACTCACAAGGCGATGGCGAGATGATACCGCGTG GTGTGCAAGTGCAAAAAGTACCAGATAACCCTAGTTATGCCAGAAGTTTATGA GACAATAAAGAGACTTGGGTTGAAGACAAATGGCACACTACGCCAAGAGGG TGGAGATAAGGGCGATCATAGAGGAACTGGTGCTGGCGAAAGCCACGCCAA CTGA
ОПС4	ATGGCACACTACGCCAAGAGGGTGGAGATAAGGGCGATCATAGAGGAACTG GTGCTGGCGAAAGCCACGCCAACTGAGGACGCATCCGAAAGTGGCTACGACC GAAATATGTACCTGAATACTCTCTTCGGGTACATCGCCTTGGTCGGGACAAGC AAGAAGGCGGTTCAATTATGGGGAGGTAGATATAGTAGGACCTAAAGCTAGCA AGAAAACGGGGATCGACCCTCGCGGAAAGATGGTTGTATCGGAGCTGGTCGG CAGAATGCGCACTCTGAGCGTGCGGTTAGTGAGGGACCTGTAAAAGGTGCA ACCTTGAGGCAGATGTGTGAGCCTTTCGCACAGAACGCCTATGACTTCCTCGT GCTTATGGCGGAGATGGGCACCTATTACAGCTAGCCACAAAGATGACGAGG TCAGGCTTTAAGGAACCACAGGTTATGTTGACTTTGCGTCGGGCTTAGATTT GAAAGCACTGACCCTACAAGAAGCCACTGTGATACAGGCTATGCACTCACGT CTCTTTCGGACAGAAGGTGCAAAGGGGGTATTCAACGCTCAATCATCTGTGCG GTGAGCAGGCTGTCGAGATATAG
ОПС5	ATGGATGACCCATCGTTTCTCGCGGGTAGGTCCACGTTTGCTAAACGTAGGCG CGCTAGGCGCATGAATGTGTGTAAGTGTGGTGCTATAATGCACAATAATGAG GACTGCAAGTCCAGTAGTATTTCCGGTCATAAACTCGATAGATTGCGGTTTCGT CAAAGAGGGAAGAGTAACTCTAACGGGTGAGACTCCTGTTTACCGGACTTGG ATCAGATGGGTTGAGACTGAATATCACATATATATATTAGAAACCTCAGACG ATGAGAAATGA

Таблица Б.2 - Белки, кодируемые геном ВАВ

ОПС, белок	Нуклеотидная последовательность (5' - 3')
ОПС1 - РНК-зависимая РНК-полимераза	MSISVSSQRVAVSNLYTNGSEESVKAIKELKSKRLLLETETRLDGLFDY YIPDTLREILSGYGMFSVHSFQGHAPVSKMIENHMLYRVAPNYFSN NTLVVSCKEGKIKRLRLKNAGNRNLTQYNRLVHAKDHHRYENAF RELDVGNLTNLINKESQSECIFIHDEVQYWSLDEMQRFLGSLSKVDRI VYSIYPAEVEAGYSQSLFPEAYTFDLKEGRLIWYPDGKAEGAYTQPIN PWLLRCSKTESKGRSWTITKLQTVGAHHLFSAIRGSYLTEESYKYDN FTIINPNDILRGRRGSKPLYLRARMIKPTLLYLLALKKSDSNSAVAKLR MLSSREENMDEALFVAQLAKQIRDTALYDKMGNPSLRSILSESFYDV AGNLFTRLFNRPEYDARCLEKFIRACETTEIHIGRRFMEGVLRGSSYQV QKVVDWVEDEEANALSEVNLVELTRNEREPQPYGSEQLQSGGARVR FPLSRLMRAHEMVHEAQFEVNFNHIRIVCSSKALVHLRQYLIRLGRFK FMEGRAIEDIQDIQEGLELGLITEEEAESRLLPPDNIAPSEEAQEEVQQS GPIEEVSEKFMGARKLVKENIYSEKLNREVAFYSSRYSKQYSYKGG HHSLGWDKALDELIQELGLDESYDHCLIQRYSEGGSINFHADDEPCYL PGGTVVTVNLNGEAIFELKENTSGKTESKRLKDGDVFTMGAGMQQT HKHKVTSLTNGRCSITLRNKTVDYEARTAINS DYEDVAALDEGIEY LQKNQGNMCSLKAF AEHMQLSIPSVISIVNGASPQTLREIEGGGISVAT LVNLSRALDFPIAIHGERGYAETPGTYRRLHLKITGHVEPFDGVISKG GLKEALLSDGVGIGLFRVDKNKADRLAQSFYNGNTGVLLGKYNKG KMHSEGIDEPKEVLTAFGFAGSGKSHWCQTILKHCSVEKALVISPRKV LKDDWTSKISKRHKVVTFEVAFMDDYGCKDVVIDEIGLLPPGYIDLVI AVHRPRTLVLGDPLQSTYHSKRDNVVLEASQEDIFARIKGQLPYLCY SHRLPKNCRLFELECMGAESEKRVTYRSSRLKDEPVICATRAMKEEK GSGWYTVSETQGLSFKSCLHLDEHWAKKEDEDVMVALTRSRGEIGI NVTNALKKTLIASAKSTLLRKVLKGETYRRSEIVAMARKHIPEVTVLF
	EESRLAENVDYEARLAGDPYLSLLSLYDEIEMDEVEIEEPVALEPVK THLALSEKMNELAPFELKAKEYREQYTDAGRTEQIDEEGYSGEANP MTHKALYLKHTSDDTATFMMSVRKRLRFRNYEANRRKSKACNGIGK QMFSVFKETYQLKEIDSLPDLERCMEFMMKKRVEKSAGLIEQHAGRS DPDWPSNYLKIFLKQQTCTKMEKRGVDAKAGQTIACFAHSVLCRFGP ILRQTERALRELLPENVMISQKNYMDLDKWAKTWVESMMGTDSDY EAFDRSQDEKVLDDLEVEVLRFFLWPEDLIREYEELKLMMGCALGDLA VMRFSGEFGTFFFNTICNMVFSCMRYHMDRNTPICFAGDDMYSPGILR TKNDYEGTLDQLTLKAKVHISEEPLFCGWRMSPFIVKEPNLILDRWK IAKRSNLSLCLVNYAIEASFGYRLSEYLYDVNIDVDAQQELIREIVEK KHLLPKKIADLFSEDECEAHSDGDEDFLSNDIAKLYRVG
ОПС2 - белок не известной функции	MTSQSCTELVEFLSQGGDRCSLDRTSLESLSYTQCLYLLSDLRGLGYH SIDSILHILECSEAERFEIYRIFRRHGIGIGEALQLGVRKSLCYSPRSTAEI LDDLRSRISRGGAFLPSDLGAVKGELLVTFQPSRLSVDLYANTKKVCT RTCQKGKDAGYVARRFSGYKGLALRSQGN
ОПС3 - белок передвижения	MSHGDSQATKGSLSDPKEIKIFNVKRNTKDLETNLKSLHRGDVYDTE LIERVFPRRTKKCVVHKELVVQDGRVDCELDLMDGGLDDIDETEYPL YHVGCIIVIALMPHGKNLQKGVVVEVIDTRLKVGSGRISRSVMDMSKP LSACADFPGYFISTDLLNGYTLHLSITTTDLQFVDGVHPFSVQLMNIG RLCGDDMKTRYAVGEASKILHQNILNSQGDGEMIPRGVQVQKVPDTL VMPEVYETIKRLGLKTNGTLRQEGGDKGDHRTGAGESHAN
ОПС4 - капсидный	MAHYAKRVEIRAIIEELVLAKATPTEDASESGYDRNMYLNTLFGYIAL VGTSKKAVHYGEVDIVGPKASKKTGIDPRGKMVVSELVGRMRTLVS

Продолжение таблицы Б.2	
ОПС, белок	Нуклеотидная последовательность (5'-3')
белок	AVSEGPVKGATLRQMCEPFAQNAYDFLVLMAEMGTYSQLATKMTRS GFKEPQVMFDFASGLDLKALTLQEATVIQAMHSRLFRTEGAKGVFNA QSSVGEQAVEI
ОПС5 - P10, супрессор РНК - интерференции	MDDPSFLAGRSTFAKRRRARRMNVCKCGAIMHNNEDCKSSSISGHKL DRLRFVKEGRVTLTGETPVYRTWIRWVETHEYHIYILETSDDEK

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Авторское свидетельство на программу DNARNaref

Авторлық құқық объектісіне құқықтардың мемлекеттік тіркелу туралы	
№ <u>1890</u>	1 тамыз 2017 ж.
ҚУДЛҚ	
Қазақстан Республикасы Әділет министрінің авторлардың етініші бойынша авторлары Диліра Александровна Грищенко, Игорь Сергеевич Грищенко болып табылатын авторлық құқықпен қорғалатын объектіге айрықша мүлдікті құқықтар «DNARNaref» (ЭЭМ-ге арналған бағдарлама) атауымен тіркелгені куәландырылады.	
Авторлардың етініші бойынша авторлық құқықпен қорғалатын объектіге айрықша мүлдікті құқықтар және 2017 жылғы 30 сәуірде жасалған объекті Д.А. Грищенкоға, И.С. Грищенкоға тиесілі және авторлар жотарында қорғалатын объектіні жасаған кезде басқа адамдардың зиянкерлік меншік құқығы бұзылмағандығына көңілдік береді.	
Тізімде 2017 жылғы 1 тамызда жасалған № <u>1890</u> жазба бар.	
Министрдің орынбасары	Әзімова

СВИДЕТЕЛЬСТВО о государственной регистрации прав на объект авторского права	
№ <u>1890</u>	1 августа 2017 г.
Настоящим удостоверяется, что в Министерстве Юстиции Республики Казахстан зарегистрированы исключительные имущественные права на объект авторского права под названием «DNARNaref» (программа для ЭВМ), авторами которого по заявлению авторов являются Грищенко Диліра Александровна, Грищенко Игорь Сергеевич.	
По заявлению авторов исключительные имущественные права на объект авторского права, созданный 30 апреля 2017 года, принадлежат Грищенко Д.А., Грищенко И.С. и авторы гарантируют, что при создании вышеуказанного объекта не были нарушены права интеллектуальной собственности других лиц.	
Занесён в реестр за № <u>1890</u> от 1 августа 2017 года вместе с.	
Заместитель министра	Э. Азимова

ИС 009529

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Патент на изобретение «Набор синтетических олигонуклеотидов для обнаружения вирусов яблони методом ОТ-ПЦР»



1958897

КАЗАКСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІНІҢ
"ҰЛТТЫҚ ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК
ИНСТИТУТЫ"
ШАРУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ
ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРНЫ



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ»
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Қорғалжын тас жолы, 3Б ғимараты, Астана қ. Қазақстан Республикасы, 010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz

шоссе Қорғалжын, здание 3Б, г. Астана, Республика Казахстан, 010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz

Номер заявки / Отнімін номері: №2017/0940.1
Дата подачи заявки / Отнімін берілген күні: 19.10.2017

28 ФЕВ 2019
8553
ХАБАРЛАМА

(54) **КТ-ПТР тәсілімен алма ағашы вирустарын анықтауға арналған синтетикалық олигонуклеотидтердің жиыны**

№ 2017/0940.1 «КТ-ПТР тәсілімен алма ағашы вирустарын анықтауға арналған синтетикалық олигонуклеотидтердің жиыны» өтінімі бойынша Қазақстан Республикасының өнертабыска патент беру туралы «ҰЗМИ» РМК сараптама ұйымының шешімі қабылданғанын хабарлаймыз.

1. Заннның * 26 бабы 1 тармағына сәйкес сараптама ұйымы өнертабыска патент беру туралы мәліметтерді он сегіз ай өткеннен кейін бюллетеньде жариялайды. Өтінім берушінің өтінішхаты бойынша сараптама ұйымы мәліметтерді көрсетілген мерзімнен ерте жариялайды.

Өнертабыска қорғау құжатының беру мәліметтерін мерзімінен бұрын жарияла ғаныз келсе, қорғау құжатының беру мәліметтерін жеделдетіп жариялау туралы өтінішті (№4 қосымша) төменде 2 тармақта көрсетілген құжаттармен бірге ұсынуыңыз қажет.

Егер қорғау құжатының беру мәліметтерін мерзімінен бұрын жариялау қажеттілігі болмаса, 3 тармақта көрсетілгендей, тек төлем құжатын жіберуіңізді сұраймыз. Бұл жағдайда, 2 тармақта көрсетілген құжаттар тізілімі Заңмен бекітілген уақытта ұсынылған жағдайда мемлекеттік қызмет көрсетіледі.

2. «Өнеркәсіптік меншік саласындағы қорғау құжаттарын беру» мемлекеттік көрсетілетін қызмет стандарты» мемлекеттік көрсетілетін қызмет Стандартының** 9 тармағына сәйкес келесі құжаттарды ұсыну қажет.

- Стандарттың 2-қосымшасына сәйкес нысан бойынша мемлекеттік қызметті ұсыну үшін өтініш (№2 қосымша);

- төлемді растайтын құжат;

- сенімхат, (егер өтініш өкіл арқылы берілген жағдайда), немесе сенімхаттың көшірмесі (егер өтініш патенттік сенім білдірілген өкіл арқылы берілген жағдайда).

3. Заннның* 22 бабы 9 тармағына сәйкес өтінім берушіге сараптама ұйымының патент беру туралы шешім қабылдағаны туралы хабарлама жіберілген күннен бастап үш ай ішінде өтінім беруші сараптама ұйымына патентті беруге дайындағаны және жариялағаны үшін тиісті төлемді растайтын құжатты ұсынады. РМК «ҰЗМИ» көрсететін жұмыстар мен қызметтер бағаларына сәйкес өнертабыска, қорғау құжатын беру

РГП на ПХВ Институт Биологии и Биотехнологии Растений

ул. Тимирязева 45, город Алматы, 050040
nurbol.g@mail.ru, ipbbkz@gmail.com

УВЕДОМЛЕНИЕ

(54) **Набор синтетических олигонуклеотидов для обнаружения вирусов яблони методом ОТ-ПЦР**

Настоящим уведомляем Вас о том, что экспертной организацией РГП «НИИС» принято решение о выдаче патента Республики Казахстан на изобретение по заявке № 2017/0940.1 «Набор синтетических олигонуклеотидов для обнаружения вирусов яблони методом ОТ-ПЦР»

1. Согласно пункту 1 статьи 26 Закона* экспертная организация публикует в бюллетене сведения о выдаче патента на изобретение по истечении восемнадцати месяцев с даты подачи заявки. По ходатайству заявителя экспертная организация публикует сведения ранее указанного срока.

Для публикации сведений о выдаче патента ранее установленного срока, Вам необходимо предоставить ходатайство о досрочной публикации (приложение №4) вместе с документами указанными в пункте 2.

В случае отсутствия необходимости в досрочной публикации, просим Вас предоставить только платежный документ, указанный в пункте 3. В этом случае государственная услуга будет оказана при предоставлении перечня документов указанных в пункте 2 в установленные Законом сроки.

2. Согласно пункту 9 Стандарта** для оказания государственной услуги «Выдача охранного документа на объект промышленной собственности» необходимо представить следующие документы:

- заявление на оказание государственной услуги по форме согласно приложению 2 к Стандарту (приложение №2);

- документ, подтверждающий оплату;

- доверенность, (если заявление подается представителем) или копия доверенности, (если заявление подается патентным поверенным).

3. В соответствии с пунктом 9 статьи 22 Закона* в течение трех месяцев с даты направления заявителем уведомления о принятии экспертной организацией решения о выдаче патента заявитель представляет в экспертную организацию документ, подтверждающий соответствующую оплату за подготовку к выдаче патента и публикацию. В соответствии с Ценами на работы и услуги, оказываемые РГП «НИИС» оплату за проведение работ по публикации в Государственном реестре сведений о регистрации и о выдаче охранного документа на



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІНІҢ
"ҰЛТТЫҚ ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК
ИНСТИТУТЫ"
ШАРУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ
ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРНЫ



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ»
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Коргалжин тас жолы, 3Б ғимараты, Астана қ. Қазақстан Республикасы,
010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz

шоссе Коргалжин, здание 3Б, г. Астана, Республика Казахстан, 010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz



**РГП на ПХВ «Институт Биологии
и Биотехнологии Растений» МОН
РК КН**

ул. Тимирязева 45, г. Алматы, 050040
nurbol.g@mail.ru, ipbbkz@gmail.com

РЕШЕНИЕ

о выдаче патента на изобретение

Регистрационный номер заявки 2017/0940.1

Дата подачи заявки 19.10.2017

В результате экспертизы заявки на изобретение по существу установлено, что заявленное (-ые) изобретение (-я) соответствует (-ют) условиям патентоспособности согласно пункту 1 статьи 6 Патентного закона Республики Казахстан (далее - Закон), на основании пункта 9 статьи 22 Закона принято решение о выдаче патента на изобретение.

Приложение: Заключение экспертизы на 2 л. в 1 экз.

Первый заместитель директора

Л. Омаров

К. Батаева

КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІНІҢ
"ҰЛТТЫҚ ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК
ИНСТИТУТЫ"
ШАРУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ
ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРНЫ



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ»
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Қорғалжын тас жолы, 3Б ғимараты, Астана қ. Қазақстан Республикасы,
010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz

шоссе Қорғалжын, здание 3Б, г. Астана, Республика Казахстан, 010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz

Дата поступления заявки: 19.10.2017



**РГП на ПХВ «Институт Биологии
и Биотехнологии Растений» МОН
РК КН**

ул. Тимирязева 45, г. Алматы, 050040
nurbol.g@mail.ru, ipbbkz@gmail.com

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о выдаче патента на изобретение

(21) Заявка № 2017/0940.1

(22) Дата подачи заявки 19.10.2017

ПРИОРИТЕТ УСТАНОВЛЕН:

- ☒ (22) по дате подачи заявки
☐ (23) по дате поступления
☐ дополнительных материалов от _____ к более ранней заявке № _____ от _____
☐ (66) по дате подачи ранее поданной заявки № _____ от _____
☐ (62) по дате подачи первоначальной заявки № _____ от _____
☐ по дате подачи первой заявки в государстве-участнике Парижской конвенции
(31) № приоритетной заявки (32) Дата подачи приоритетной заявки (33) Код страны приоритетной заявки
(85) Дата перевода международной заявки на национальную фазу
(86) Регистрационные данные заявки РСТ

(71) Заявитель(и)

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым Министрлігі Ғылым комитетінің "Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты" шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорны (KZ)

Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Институт биологии и биотехнологии растений" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (KZ)

(72) Автор (ы)

Галиакпаров Нурбол Нурпатович (KZ); Омашева Мадина Ерболовна (KZ); Гриценко Диляра Александровна (KZ)

(73) Патентообладатель (и)

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым Министрлігі Ғылым комитетінің "Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты" шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорны (KZ)

Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Институт биологии и биотехнологии растений" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (KZ)

(51) МПК

C12Q 1/68 (2018.01), C12N 15/11 (2006.01), C12N 7/00 (2006.01)

(54) Название изобретения

Набор синтетических олигонуклеотидов для обнаружения

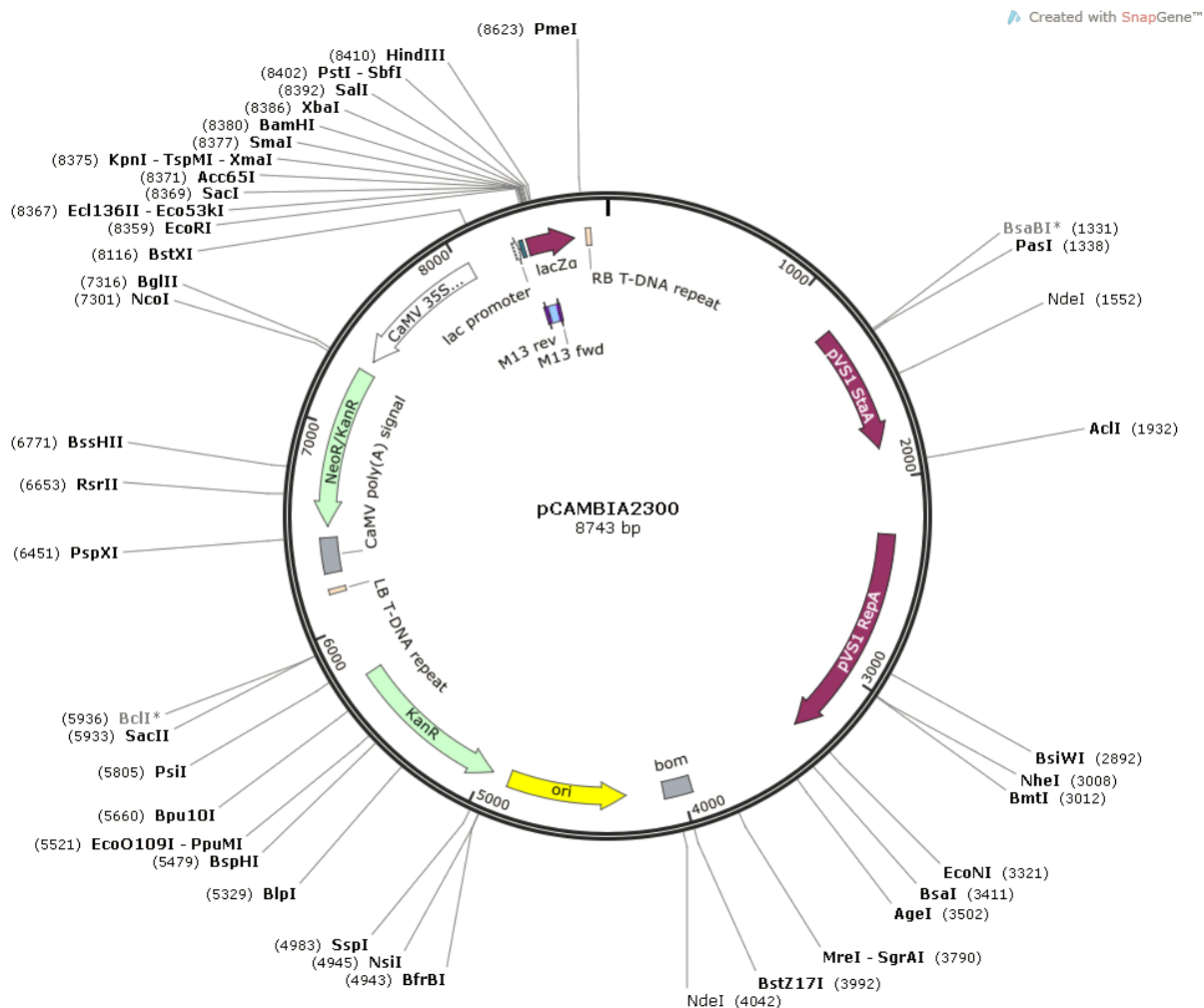
вирусов яблони методом ОТ-ПЦР

КТ-ПТР тәсілімен алма ағашы вирустарын анықтауға арналған

синтетикалық олигонуклеотидтердің жиыны

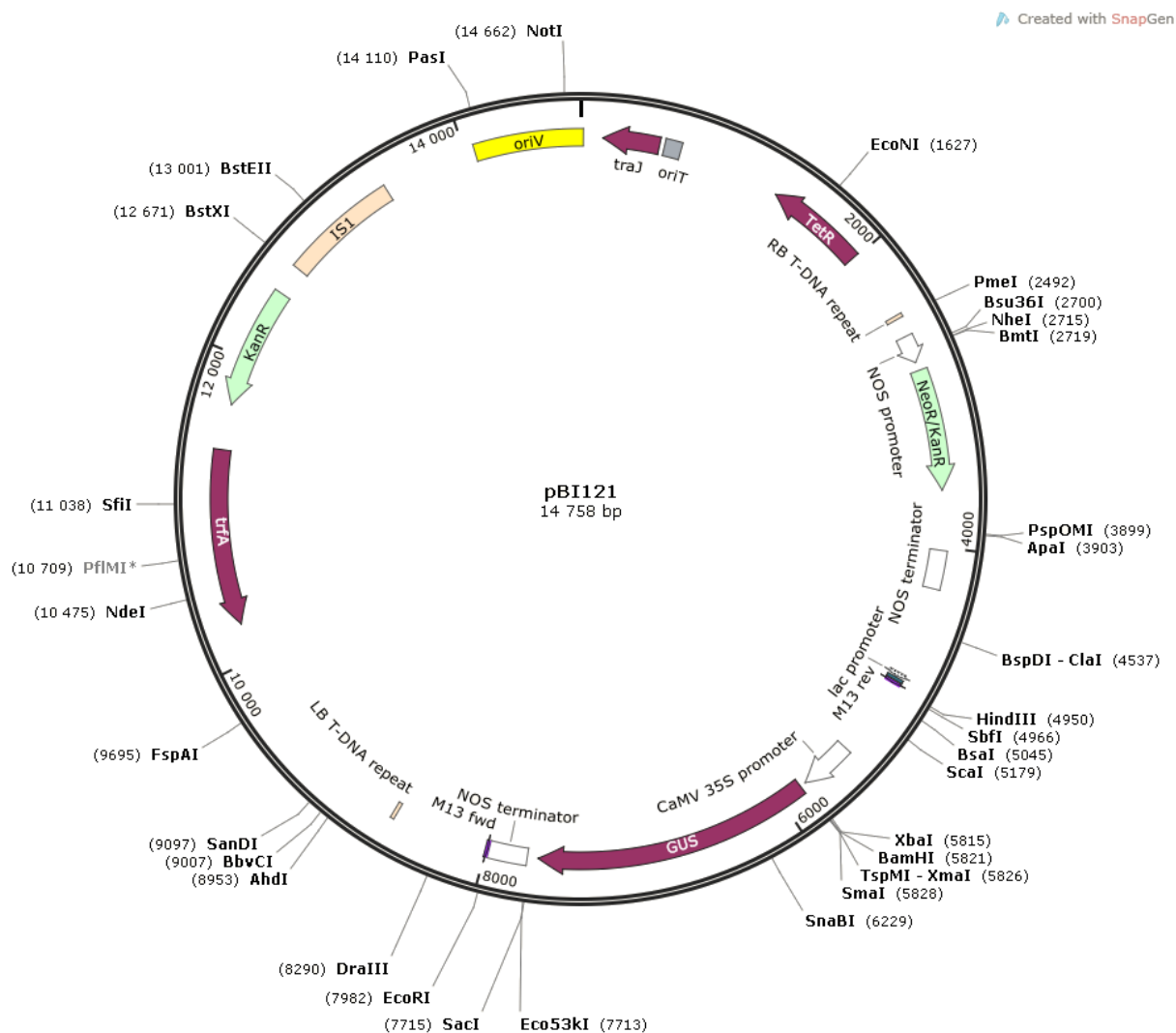
ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Схематическое изображение плазмиды pCambia 2300



ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Схематическое изображение плазмиды pBI121



ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Заявка на патент «Т - вектор для клонирования ПЦР - продуктов разного размера»

Приложение 1
к Правилам составления, оформления и рассмотрения
заявки на изобретение, внесения сведений в государственный реестр
изобретений Республики Казахстан, а также выдачи охранного документа

Форма ИЗ-1П Дата поступления

Дата поступления 19 ОКТ 2017	(85) Дата перевода международной заявки на национальную фазу	(21) Регистрационный № 201410934.1	(22) Дата подачи
--	--	--	------------------

☐ (86) регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные получающим ведомством

☐ (87) номер и дата международной публикации международной заявки

☐ (96) номер евразийской заявки и дата подачи заявки, установленные получающим ведомством

☐ (97) номер и дата публикации евразийской заявки

**ЗАЯВЛЕНИЕ
о выдаче патента
Республики Казахстан
на изобретение**

В РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Министерства Юстиции Республики Казахстан

010000, г. Астана, Левобережье, Дом Министерства,
Пр. Мәңгілік ел, дом 8, подъезд №1

Предоставляя указанные ниже документы, прошу (просим) выдать патент Республики Казахстан на изобретение на имя заявителя(ей)	Код страны по стандарту ВОИС ST.3 (если он установлен)
(71) Заявитель(и): Республиканское Государственное Предприятие на Праве Хозяйственного Ведения Институт Биологии и Биотехнологии Растений, 050040, г. Алматы, ул. Тимирязева 45	KZ

(указывается полное имя или наименование и местожительство или местонахождение.
Данные о местожительстве авторов-заявителей приводятся в графе, рядом с графой с кодом (72))

Заполняется только при испрашивании приоритета по дате, более ранней, чем дата подачи заявки в НИИС

Прошу (просим) установить приоритет изобретения по дате:

☐ подачи первой(ых) заявки(ок) в государстве-участнике Парижской конвенции (п.2 ст.20 Закона)

☐ подачи более ранней заявки в НИИС в соответствии с п. 4 ст. 20 Закона

☐ подачи первоначальной заявки в НИИС в соответствии с п. 5 ст. 20 Закона

☐ приоритета первоначальной заявки (п.5 ст. 20 Закона)
(номер заявки _____, дата подачи _____)

☐ поступления дополнительных материалов к более ранней заявке (п. 3 ст. 20 Закона)

(31) № первой, более ранней, первоначальной заявки	(32) Дата испрашиваемого приоритета	(33) Код страны подачи по ST.3 (при испрашивании конвенционного приоритета)

(54) Название изобретения

Т-вектор для клонирования ПЦР продуктов разного размера

Адрес для переписки (полный почтовый адрес и имя адресата)

**РГП на ПХВ Институт Биологии и Биотехнологии Растений,
050040, г. Алматы, ул. Тимирязева 45**

Телефон: 8 (727) 394 77 68 Мобильный тел. 8 (777) 277 56 24 Факс:

Адрес электронной почты: **nurbol.g@mail.ru**

(74) Патентный поверенный (полное имя, регистрационный номер) или представитель заявителя(ей) (полное имя или наименование)

Перечень прилагаемых документов	Кол-во л. в 1 экз.	Кол-во экз.
☐ приложение к заявлению		
☐ описание изобретения	6	2
☐ формула изобретения	1	2
☐ чертеж(и) и иные материалы	2	2
☐ реферат	1	2
☐ документ об оплате подачи	1	1
☐ документ, подтверждающий наличие оснований для уменьшения размера оплаты		
☐ копия(и) первой(ых) заявки(ок) (при испрашивании конвенционного приоритета)		
☐ документы заявки на иностранном языке		
☐ доверенность, удостоверяющая полномочия патентного поверенного или представителя		
☐ другой документ (указать)		



№ фигуры чертежей, предлагаемой для публикации с формулой(рефератом)

(72) Автор(ы) (указывается полное имя)	Полный почтовый адрес местожительства, включая наименование страны и ее код по стандарту ВОИС ST.3, если он установлен	Подпись(и) автора(ов)-заявителя(ей) и/или автора(ов)
1. Галиакпаров Нурбол Нурпатович	Алматинская обл., Илийский район, п. Байсерке, дом 15/2, 040705, Казахстан (KZ)	
2. Гриценко Диляра Александровна	г. Алматы, мкр. Жетысу-2, д.5, кв.58, А10Е3Х1, Казахстан (KZ)	
3. Дерябина Нина Дмитриевна	г. Алматы, ул. Шереметьева, д.29, кв.1, Казахстан (KZ)	

Я(мы) _____ (Ф.И.О.)

прошу (просим) не упоминать меня (нас) как автора(ов) при публикации сведений о выдаче патента на изобретение

Подпись(и) автора(ов):

Подпись

Генеральный директор РГП на ПХВ «ИББР»
д.б.н., профессор, академик НАН РК

подпись(и) заявителя(ей), не являющегося(ихся) автором(ами). (при подписании от имени юридического лица подпись руководителя скрепляется печатью)



Жамбакин К.Ж.

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Патент на изобретение «Вирусный вектор для транзientной экспрессии гетерологичных белков в растениях»



1994290

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІНІҢ
"ҰЛТТЫҚ ЗАТТӨРЖІК МЕНШІК
ИНСТИТУТЫ"
ШАРАУШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ
ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРНЫ



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ»
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Қорғалжын тас жолы, 3Б ғимараты, Астана қ. Қазақстан Республикасы, 010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91,
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz

шоссе Қорғалжын, здание 3Б, г. Астана, Республика Казахстан, 010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91,
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz



Номер заявки / Отінінің нөмірі: №2017/0938.1
Дата подачи заявки / Отінінің берілген күні: 19.10.2017

РГП на ПХВ Институт Биологии и Биотехнологии
Растений
ул. Тимирязева 45, город Алматы, 050040
nurbol.g@mail.ru, ipbbkz@gmail.com

УВЕДОМЛЕНИЕ

(54) Вирусный вектор для транзientной
экспрессии гетерологичных белков в растениях

№ 2017/0938.1 «Өсімдіктердегі гетерологиялық
акуыздардың транзientті айқындалуына
арналған вирустық вектор» отінімі бойынша
Қазақстан Республикасының өнертабысқа патент
беру туралы «ҰЗМИ» РМК сараптама ұйымының
шешімі қабылданғанын хабарлаймыз.

Настоящим уведомляем Вас о том, что экспертной
организацией РГП «НИИС» принято решение о
выдаче патента Республики Казахстан на
изобретение по заявке № 2017/0938.1 «Вирусный
вектор для транзientной экспрессии
гетерологичных белков в растениях»

1. «Өнеркәсіптік меншік саласындағы қорғау
құжаттарын беру» мемлекеттік көрсетілетін қызмет
стандарты» мемлекеттік көрсетілетін қызмет
Стандартының** 9 тармағына сәйкес келесі
құжаттарды ұсыну қажет.
- Стандарттың 2-қосымшасына сәйкес нысан бойынша
мемлекеттік қызметті ұсыну үшін отініш (№2
қосымша);
- төлемді растайтын құжат;
- сенімхат, (егер отініш өкіл арқылы берілген жағдайда),
немесе сенімхаттың көшірмесі (егер отініш патенттік
сенім білдірілген өкіл арқылы берілген жағдайда).

1. Согласно пункту 9 Стандарта** для оказания
государственной услуги «Выдача охранного документа
на объект промышленной собственности» необходимо
представить следующие документы:

- заявление на оказание государственной услуги по
форме согласно приложению 2 к Стандарту (приложение №2);
- документ, подтверждающий оплату;
- доверенность, (если заявление подается
представителем) или копия доверенности, (если
заявление подается патентным поверенным).

2. Заннның* 22 бабы 9 тармағына сәйкес отінім берушіге
сараптама ұйымының патент беру туралы шешім
қабылдағаны туралы хабарлама жіберілген күннен бастап
үш ай ішінде отінім беруші сараптама ұйымына патентті
беруге дайындағаны және жариялағаны үшін тиісті
төлемді растайтын құжатты ұсынады. РМК «ҰЗМИ»
көрсететін жұмыстар мен қызметтер бағаларына сәйкес
өнертабысқа, қорғау құжатын беру және оларды тіркеу
туралы мәліметтерді Мемлекеттік тізілімде жариялау
бойынша жұмыстарды жүргізу үшін **33253,92 тенге**,
оның ішінде ҚҚС сомасындағы төлемді келесі
реквизиттер бойынша төлеу қажет:
ҚР ӘМ «ҰЗМИ» РМК. БСН - 020940003199
"Нурбанк" АҚ. Есеп айырысу шоты:
ИИК: KZ8584905KZ006015415;
БИК: NURSKZKX; КБЕ: 16. КНП — 859
Төлем жасау кезінде Төлеушінің БИН/ИНН және
тапсырыстың тіркеу нөмірін көрсету керек.

2. В соответствии с пунктом 9 статьи 22 Закона* в
течение трех месяцев с даты направления заявителю
уведомления о принятии экспертной организацией
решения о выдаче патента заявитель представляет в
экспертную организацию документ, подтверждающий
соответствующую оплату за подготовку к выдаче патента
и публикацию. В соответствии с Ценоми на работы и
услуги, оказываемые РГП «НИИС» оплату за проведение
работ по публикации в Государственном реестре
сведений о регистрации и о выдаче охранного документа
на изобретение в размере **33253,92 тенге**, в т.ч. НДС
необходимо произвести по следующим реквизитам:
РГП «НИИС» МЮ РК. БИН: 020940003199
АО "Нурбанк", Расчетный счет :
ИИК: KZ8584905KZ006015415;
БИК: NURSKZKX; КБЕ: 16. КНП — 859
При оплате необходимо указать БИН/ИНН
Плательщика и регистрационный номер заявки.

Көрсетілген құжат ұсынылмаған кезде өткізіп алған
мерзімді қалпына келтіру төлемінің төленгені туралы
құжат ұсынылған жағдайда төлем мерзімі үш ай ішінде
қалпына келтірілуі мүмкін. РМК «ҰЗМИ» көрсететін
жұмыстар мен қызметтер бағаларына сәйкес мерзімді
қалпына келтіру төлемі **31524,72 тенге** құрайды.
Керісінше жағдайда отінім кері қайтарып алынды деп

При непредставлении указанных документов срок
оплаты может быть восстановлен в течение трех месяцев
при условии представления документа об оплате
восстановления пропущенного срока в размере **31534,72
тенге**, в т.ч. НДС. В противном случае заявка считается
отозванной, делопроизводство по заявке прекращается.



1989098

КАЗАКСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛІЕТ МИНИСТРЛІГІНІҢ
"ҰЛТТЫҚ ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК
ИНСТИТУТЫ"
ШАРУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ
ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРНЫ



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ»
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Коргалжин тас жолы, 3Б ғимараты, Астана қ. Қазақстан Республикасы,
010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz

шоссе Коргалжин, здание 3Б, г. Астана, Республика Казахстан, 010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91,
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz



**РГП на ПХВ Институт Биологии
и Биотехнологии Растений**

ул. Тимирязева 45, город Алматы, 050040
nurbol.g@mail.ru, ipbbkz@gmail.com

РЕШЕНИЕ

о выдаче патента на изобретение

Регистрационный номер заявки 2017/0938.1

Дата подачи заявки 19.10.2017

В результате экспертизы заявки на изобретение по существу установлено, что заявленное(-ые) изобретение(-я) соответствует(-ют) условиям патентоспособности согласно пункту 1 статьи 6 Патентного закона Республики Казахстан (далее - Закон), на основании пункта 9 статьи 22 Закона принято решение о выдаче патента на изобретение.

Приложение: Заключение экспертизы на 2 л. в 1 экз.

Первый заместитель директора

К. Батаева

КАЗАКСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІНІҢ
"ҰЛТТЫҚ ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК
ИНСТИТУТЫ"
ШАРАУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ
ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРНЫ



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ»
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Коргалжин тас жолы, 3Б ғимараты, Астана қ. Қазақстан Республикасы,
010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz

шоссе Коргалжин, здание 3Б, г. Астана, Республика Казахстан, 010000
Тел: (7172) 62 15 04 62 15 91
<http://www.kazpatent.kz>, e-mail: kazpatent@kazpatent.kz

Дата поступления заявки: 19.10.2017



**РГП на ПХВ Институт Биологии
и Биотехнологии Растений**
ул. Тимирязева 45, город Алматы, 050040
murbol.g@mail.ru, ipbbkz@gmail.com

ЗАКЛЮЧЕНИЕ о выдаче патента на изобретение

(21) Заявка № 2017/0938.1

(22) Дата подачи заявки 19.10.2017

ПРИОРИТЕТ УСТАНОВЛЕН:

- ☒ (22) по дате подачи заявки
☐ (23) по дате поступления
☐ дополнительных материалов от _____ к более ранней заявке № _____
☐ (66) по дате подачи ранее поданной заявки № _____ от _____
☐ (62) по дате подачи первоначальной заявки № _____ от _____
☐ по дате подачи первой заявки в государстве-участнике Парижской конвенции
(31) № приоритетной заявки (32) Дата подачи приоритетной заявки (33) Код страны приоритетной заявки
(85) Дата перевода международной заявки на национальную фазу
(86) Регистрационные данные заявки РСТ

(71) Заявитель(и)

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым Министрлігі
Ғылым комитеті «Өсімдіктер биологиясы және
биотехнологиясы институты» шаруашылық жүргізу
құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорны (KZ)
Республиканское государственное предприятие на праве
хозяйственного ведения «Институт биологии и
биотехнологии растений» Министерства образования и науки
Республики Казахстан Комитет науки (KZ)

(72) Автор (ы)

Галиакпаров Нурбол Нурпатович (KZ); Гриценко Диляра
Александровна (KZ); Дерябина Нина Дмитриевна (KZ)

(73) Патентообладатель (и)

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым Министрлігі
Ғылым комитеті «Өсімдіктер биологиясы және
биотехнологиясы институты» шаруашылық жүргізу
құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорны (KZ)
Республиканское государственное предприятие на праве
хозяйственного ведения «Институт биологии и
биотехнологии растений» Министерства образования и науки
Республики Казахстан Комитет науки (KZ)

(51) МПК

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/83 (2006.01)

(54) Название изобретения

Вирусный вектор для транзientной экспрессии
гетерологичных белков в растениях
Өсімдіктердегі гетерологиялық ақуыздардың транзientті
айқындалуына арналған вирустық вектор

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Экспрессия антигенов *Erwinia amylovora* в растениях при использовании вектора на основе полного генома вируса А винограда

Акт внедрения

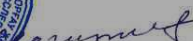
в производство научно-технической разработки

в рамках докторской диссертации PhD докторанта 3-го курса, Гриценко Д.А.
«Создание вирусного вектора для получения рекомбинантных белков в растениях и исследование эффективности их экспрессии»

1. Наименование внедренной разработки: «Внедрение разработанного вирусного вектора на основе полного генома вируса А винограда для экспрессии антигенов *Erwinia amylovora* в растениях»
2. Наименование организации, адрес: лаборатория молекулярной генетики и биохимии, КазНИИЗиКР им Ж. Жиембаева, Кудтобе 1.
3. Срок внедрения: начало – 01.01. 2018г., окончание -01.07.2018г.
4. Условия внедрения: экспрессия важных антигенов *Erwinia amylovora* в растениях.
5. Результаты внедрения: были получены SpaR и SpaS антигены *Erwinia amylovora* в растениях методом транзientной экспрессии при использовании вирусного вектора на основе Вируса А винограда.

Вр. и.о. Генерального директора
ТОО «КазНИИЗиКР им
Ж. Жиембаева», академик
НАН РК



 Сагитов А.О.

Заведующая лабораторией
Молекулярной генетики и
биохимии, PhD



Жаманбаева Г.Т.

Экспрессия антигенов *Brucella abortus* в растениях при использовании вектора на основе деконструированного генома вируса А винограда

**Акт внедрения
научно-технической разработки**

**в рамках докторской диссертации PhD докторанта 3-го курса, Гриценко Д.А.
«Создание вирусного вектора для получения рекомбинантных белков в
растениях и исследование эффективности их экспрессии»**

1. Наименование внедренной разработки: «Внедрение разработанного вирусного вектора на основе деконструированного генома вируса А винограда для экспрессии антигенов *Brucella abortus* в растениях»
2. Наименование организации, адрес: Казахстанско - Японский инновационный центр, Казахский национальный аграрный университет, проспект Абая, 8.
3. Срок внедрения: начало – 21.06. 2018г., окончание -10.12.2018г.
4. Условия внедрения: экспрессия Omp25 антигена *B. abortus* в растениях.
5. Результаты внедрения: был получен Omp25 антиген в растениях методом транзientной экспрессии при использовании вирусного вектора на основе генома Вируса А винограда.
6. **Номер договора 20/1 от 21.06.2018. Договор прилагается.**

Директор Казахстанско-
Японского инновационного центра

Нургалиева М.Т.



Руководитель лаборатории зеленой
биотехнологии и клеточной
инженерии

Жансеркенова О.О.

Договор для акта - Экспрессия антигенов *Brucella abortus* в растениях при
использовании вектора на основе деконструированного генома вируса А
винограда

Договор
на оказание услуг № 20/1

г.Алматы

« 21 » июня 2018 г.

НАО «Казахский национальный аграрный университет», в лице проректора по финансово-экономическим и правовым вопросам Калдыбалиной Г.М., действующей на основании доверенности № 13-02-2530 от 29.07.2016 г., именуемое в дальнейшем «Заказчик», с одной стороны, и

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, в лице временно исполняющего обязанности генерального директора Жамбакина Кабыл Жапаровича, действующего на основании Приказа Государственного учреждения «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан» № 32-бгү, именуемый в дальнейшем «Исполнитель», с другой стороны,

в дальнейшем совместно именуемые как «Стороны», а по отдельности «Сторона» или, как указано выше, во исполнение Договора на грантовое финансирование № 289 от 29.03.2018 г., заключенного между Государственным учреждением «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан» и Заказчиком, по бюджетной программе 217 «Развитие науки», 102 «Грантовое финансирование научных исследований», по приоритету: «Наука о жизни и здоровье», по теме «Разработка диагностического набора ViroN-Brucella для оздоровления территории Республики Казахстан от бруцеллеза крупного рогатого скота», в соответствии с пунктом 2 статьи 2 Закона РК «О науке», заключили настоящий Договор на оказание услуг (далее - Договор) о нижеследующем:

1. Предмет договора

1.1. Исполнитель обязуется по заданию Заказчика оказать Услуги, указанные в Приложении № 1 к настоящему Договору (в дальнейшем - «Услуги») в течение периода с «**21**» июня 2018 года по «**10**» декабря 2018 года, а Заказчик обязуется своевременно принять и оплатить Услуги в соответствии с условиями настоящего Договора.

1.2. Услуги выполняются Исполнителем лично.

2. Цена и порядок оплаты

2.1. За оказанные надлежащим образом Услуги Заказчик оплачивает Исполнителю **3 050 000 (три миллиона пятьдесят тысяч)** тенге, которая включает в себя все расходы Исполнителя, связанные с исполнением своих обязательств по настоящему Договору, **включая налоги** и другие обязательные платежи в бюджет, предусмотренных законодательством Республики Казахстан, которые подлежат удержанию Заказчиком.

2.2. Оплата суммы, указанной в пункте 2.1. Договора, производится Заказчиком на основании подписанного уполномоченными представителями

Сторон Акта приемки оказанных услуг (по форме, указанной в Приложении № 2 к настоящему Договору) путем перечисления на банковский счет Исполнителя, указанный в разделе 10 настоящего Договора.

3. Права и обязанности Сторон

3.1. Исполнитель вправе:

3.1.1. Требовать у Заказчика предоставления необходимых для оказания Услуг материалы и информацию.

3.1.2. В случае одностороннего расторжения Договора Заказчиком согласно подпункту 3.3.3. пункта 3.3. Договора, требовать от Заказчика выплаты вознаграждения за Услуги, фактически оказанные до момента расторжения Договора.

3.2. Исполнитель обязуется:

3.2.1. Оказать Услуги качественно и надлежащим образом;

3.2.2. Строго выполнять все указания Заказчика по поводу оказания Услуг;

3.2.3. В течение срока действия настоящего Договора, совпадающего с периодом времени, указанным в пункте 1.1., не оказывать Услуги иным лицам, кроме Заказчика;

3.2.4. Строго соблюдать правила технической безопасности, производственной безопасности и промышленной санитарии;

3.2.5. По требованию Заказчика отчитаться перед ним по оказываемым Услугам;

3.2.6. Не разглашать конфиденциальную информацию, полученную от Заказчика в ходе оказания Услуг (и);

3.2.7. Не допускать причинения убытков Заказчику, а также не вступать в злонамеренные соглашения с третьими лицами, в результате которых могут быть причинены Заказчику убытки.

3.2.8. По завершении оказания услуг подписать и передать Заказчику акт оказанных услуг с приложением к нему результатов оказанных Услуг.

3.2.9. В случае получения от Заказчика отказа от подписания Акта приемки оказанных услуг, устранить в течение 1 (одного) календарного дня все недостатки оказанных Услуг/результатов оказанных Услуг, послужившие основанием для отказа Заказчиком от подписания Акта приемки оказанных услуг.

3.3. Заказчик вправе:

3.3.1. Давать Исполнителю обязательные для исполнения указания по поводу оказания Услуг;

3.3.2. В любое время в ходе оказания Услуг проверять деятельность Исполнителя по поводу оказания Услуг;

3.3.3. В любое время в одностороннем порядке расторгнуть настоящий Договор, предварительно уведомив об этом Исполнителя за 5 (пять) календарных дней до предполагаемой даты расторжения и выплатив Исполнителю вознаграждение за Услуги, фактически оказанные им до момента расторжения Договора. При этом Исполнитель не вправе требовать от Заказчика какого-либо возмещения связанного с расторжением Договора,

9.2. Все исключительные права на объекты интеллектуальной собственности, созданные в результате оказания Услуг по настоящему Договору переходят Заказчику с момента создания таких объектов интеллектуальной собственности.

9.3. Права и обязательства Сторон по Договору не могут быть переданы третьим лицам без предварительного письменного согласия на то другой Стороны.

9.4. В случае если одно или несколько положений настоящего Договора полностью или частично станут недействительными или не имеющими юридической силы, остальные его положения остаются в силе. Недействительное или не имеющее юридической силы положение заменяется новым положением, по возможности в полной мере отвечающим смыслу и целям ставшего недействительным или потерявшего юридическую силу положения.

9.5. В течение срока действия настоящего Договора, начало и конец которого совпадает с периодом времени, указанным в пункте 1.1. настоящего Договора, а также в течение всех последующих сроков возможной пролонгации настоящего Договора, Исполнитель не имеет право в одностороннем порядке расторгнуть настоящий Договор.

9.6. Возможность пролонгации срока настоящего Договора на таких же условиях является только приоритетным правом Заказчика.

9.7. Настоящий Договор не может быть изменен или исправлен, кроме как в случае, когда такие изменения будут оформлены в письменном виде и подписаны Сторонами настоящего Договора.

9.8. Настоящий Договор составлен на русском языке, подписан Сторонами в двух подлинных идентичных экземплярах, имеющих одинаковую юридическую силу, по одной для каждой из Сторон.

9.9. Вопросы, не урегулированные настоящим Договором, разрешаются в порядке, установленном действующим законодательством Республики Казахстан.

9.10. Название статей в настоящем договоре приведены только для ориентации и удобства пользования текстом Договора, не несут никакой смысловой нагрузки и не влияют на толкование условия Договора.

9.11. Настоящий Договор составляет и выражает все договорные условия и понимание между участвующими здесь Сторонами в отношении всех упомянутых здесь вопросов, при этом все предыдущие обсуждения, обещания и представления между Сторонами, если таковые имелись, теряют силу.

9.12. Приложения № 1 и № 2 является неотъемлемой частью настоящего Договора.

10. Юридические адреса, банковские реквизиты и подписи Сторон

ЗАКАЗЧИК НАО «Казахский национальный	Исполнитель: РГП на ПВХ «Институт биологии
--	--

аграрный университет»
050010, г. Алматы, пр. Абая, 8
телефон/факс: 8 (727) 262-11-08
БИН 990240005606
ИИК KZ51856000000011879
АГФ АО «Банк ЦентрКредит»
БИК КСJBKZKX
КБЕ -17

Проректор по финансово-
экономическим и правовым
вопросам



Калдыбалина Г.М.



и биотехнологии растений»
КН МОН РК
г. Алматы, ул. Тимирязева 45
ИИК KZ118560000000376543
БИК КСJBKZKX
БИН 061240005348
АГФ АО «Банк ЦентрКредит» г.
Алматы
Тел., факс: 8 727 394-75-56

Вр.и.о. Генерального директора



Жамбакин К.Ж.



 /Мамбетова Г.Д.)
 /Садуаев О.Т.)

 К.Рамисова



Приложение №2
к Договору оказания услуг
№ 20/1
от «21» июня 2018 г.

СМЕТА - ГРАФИК услуг Исполнителя

№	Наименование услуги	Сроки исполнения	Стоимость работы тыс.тенге	Форма отчетности
1.	Разработка и селекция поверхностного бруцеллезного антигена	21 - 30 июня 2018	598000 (пятьсот девяносто восемь тысяч) тенге	Акт приемки оказанных услуг
2.	Выделение геномной ДНК бруцеллы	01 – 31 июля 2018	322000 (триста двадцать две тысячи) тенге	Акт приемки оказанных услуг
3.	Выделение геномного ДНК, кодирующий поверхностный антиген бруцеллы	01 – 31 августа 2018	402500 (четыреста две тысячи пятьсот) тенге	Акт приемки оказанных услуг
1.4	Подбор и разработка вектора для поверхностного бруцеллезного антигена	01 Сентября 2018 – 31 Октября 2018	782000 (семьсот восемьдесят два тысячи) тенге	Акт приемки оказанных услуг
1.5	Сборка и конъюгирование всех составных частей наноплатформы для последующей трансекции в	01 ноября 2018 – 10 декабря 2018	945500 (девятьсот сорок пять тысяч пятьсот) тенге	Акт приемки оказанных услуг по пунктам 1- 5.

«Согласовано»:



Проректор по финансово-экономическим
и правовым вопросам

Калдыбалина Г.М.

Проректор по научной работе и
международным связям



Руководитель проекта

Исламов Е.И.

Ильгекбаева Г.

Специалист проекта

Садиев С.Т.

Исполнители:

РГП на ПВХ «Институт биологии
и биотехнологии растений» КН МОН РК,
Вр.и.о. Генерального директора



Жамбакин К.Ж.

Зав.лабораторией Молекулярной биологии
РГП на ПВХ «Институт биологии
и биотехнологии растений» КН МОН РК

Галиакпаров Н. Н.

К.С. Камиева

Галиакпаров Н. Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Авторское свидетельство «Прикладные научные исследования в области защиты и карантина растений для обеспечения фитосанитарной безопасности Республики Казахстан (произведение науки)»

Авторский документ, объект исследования науки Меморетский документ КУДШК № 0645 5 наурыз 2018 ж. Казахстан Республикасы Еділет министрлігіне құқық иеленушінің етініші бойынша авторлары Айы Оразұлы Сангатов, Бахытжан Алишерович Дүйсембеков, Алма Бекболатовна Жанарбекова, Рыкыт Кеңежкожаевыч Кошжасаров, Гүлжан Қалдыбекқызы, Алия Абдрахимова Джаймурына, Алмат Саламатович Динасалиев, Зибаш Бердикулова Бекназарова, Айгүл Мегесова Сарбасова, Алия Айдарұлы Дарубаев, Айгерим Аспандиярова Сейсенова, Дана Мусакызы Джумахан, Дилара Александровна Прынченко, Тогжан Серікқызы Самбетова бойынша табылатын авторлық құқықпен қорғалатын объектіге айрықша мүлкілік құқықтар «Прикладные научные исследования в области защиты и карантина растений для обеспечения фитосанитарной безопасности Республики Казахстан» (ғылыми туынды) атауымен тіркелгені куәландырылады. Құқық иеленушінің етініші бойынша авторлық құқықпен қорғалатын объектіге айрықша мүлкілік құқықтар және 2017 жылғы 7 қарашада жасалған объекті 2028 жылғы 4 қаңтарға дейін «Жазық Жиембеков атындағы Қазақ өсімдік қорғау және карантин ғылыми-зерттеу институты» ЖШС-не тиесілі және құқық иеленуші жорықарда көрсетілген объектіні жасаған кезде басқа адамдардың зияткерлік меншік құқығы бұзылмағандығына кепілдік береді. Тізімде 2018 жылғы 5 наурызда жасалған № 0645 жазба бар. Выше-министр Н. Пан	СВИДЕТЕЛЬСТВО о государственной регистрации прав на объект авторского права № 0645 5 марта 2018 г. Настоящим удостоверяется, что в Министерстве юстиции Республики Казахстан зарегистрированы на исключительные имущественные права на объект авторского права под названием «Прикладные научные исследования в области защиты и карантина растений для обеспечения фитосанитарной безопасности Республики Казахстан» (произведение науки), авторами которого по заявлению правообладателя являются Сангатов Айы Оразұлы, Дүйсембеков Бахытжан Алишерович, Жанарбекова Алма Бекболатовна, Кошжасаров Рыкыт Кеңежкожаевыч, Қалдыбекқызы Гүлжан, Джаймурына Алия Абдрахимова, Динасалиев Алмат Саламатович, Бекназарова Зибаш Бердикулова, Сарбасова Айгүл Мегесова, Дарубаев Алия Айдарұлы, Сейсенова Айгерим Аспандиярова, Джумахан Дана Мусакызы, Прынченко Дилара Александровна, Самбетова Тогжан Серікқызы. По заявлению правообладателя исключительные имущественные права на объект авторского права, созданный 7 ноября 2017 года, принадлежат до 4 января 2028 года ТОО «Қазақстан ғылыми-зерттеу институты» ЖШС-не, который гарантирует, что при создании вышеуказанного объекта не были нарушены права интеллектуальной собственности других лиц. Запись в реестре за № 0645 от 5 марта 2018 года имеется. Выше-министр Н. Пан ИС 1-693
---	---

ПРИЛОЖЕНИЕ М

МК086027 – номер в генетическом банке NCBI для нуклеотидной и аминокислотной последовательностей капсидного белка вируса хлоротической пятнистости листьев яблони – изолят ACLSV-K2, Казахстан, Алматы.

Apple chlorotic leaf spot virus isolate ACLSV-K2 coat protein mRNA, complete cds

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MK086027>

GenBank: MK086027.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☐

LOCUS	MK086027	582 bp	mRNA	linear	VRL 17-FEB-2019
DEFINITION	Apple chlorotic leaf spot virus isolate ACLSV-K2 coat protein mRNA, complete cds.				
ACCESSION	MK086027				
VERSION	MK086027.1				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Apple chlorotic leaf spot virus				
ORGANISM	Apple chlorotic leaf spot virus Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Tymovirales; Betaflexiviridae; Trivirinae; Trichovirus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 582)				
AUTHORS	Gritsenko,D.A. and Galiakparov,N.N.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (23-OCT-2018) Molecular biology, Institute of plant biology and biotechnology, Timiryazev street, 45, Almaty 050040, Kazakhstan				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..582 /organism="Apple chlorotic leaf spot virus" /mol_type="mRNA" /isolate="ACLSV-K2" /isolation_source="fresh leaf" /host="Aport" /db_xref="taxon:12175" /country="Kazakhstan: Almaty region"				
