

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ІКБГІ НАН України,
академік НАН України




Микола КУЧУК

28 червня 2023 р.

РОБОЧА ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

**Біофармінг в рослинних системах: методи отримання, виділення
та аналізу рекомбінантних білків**

для здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії

галузь знань 09 «Біологія»

спеціальність 091 «Біологія та біохімія»

профілі підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія»,
«Радіобіологія»

Робоча програма навчальної дисципліни «Біофармінг в рослинних системах: методи отримання, виділення та аналізу рекомбінантних білків» для здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія» за профілями підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія», «Радіобіологія».
27 червня 2023 року – 20 с.

Укладач програми:

Яна СІНДАРОВСЬКА,

старший науковий співробітник ІКБГІ НАН України, к.б.н.


(підпис)

Робоча програма дисципліни «Біофармінг в рослинних системах: методи отримання, виділення та аналізу рекомбінантних білків» схвалена на засіданні вченої ради ІКБГІ НАН України (протокол № 5 від 27 червня 2023 року).

Робоча програма дисципліни «Біофармінг в рослинних системах: методи отримання, виділення та аналізу рекомбінантних білків» розглянута та схвалена на засіданні відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАН України.

Завідувач відділу акад. НАН України


(підпис)

Микола КУЧУК

26 червня 2023 р.

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Біофармінг в рослинних системах: методи отримання, виділення та аналізу рекомбінантних білків» є складовою освітньо-наукової програми підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія» за профілями підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія», «Радіобіологія» і є навчальною дисципліною за вибором аспірантів.

Викладається на II курсі аспірантури **в обсязі – 60 годин (2 кредити ECTS)** зокрема: лекції – 30 годин, семінари – 6 годин, практичні заняття – 4 годин; самостійна робота – 20 годин. Передбачено 2 змістових модуля. Дисципліна завершується диференційованим заліком.

Мета дисципліни – ознайомлення аспірантів з поняттям біофармінгу, основними методами отримання рекомбінантних білків у рослинних системах, зокрема з методами створення експресійних векторних конструкцій для продукції рекомбінантних білків, методами виділення цільових білків із рослинних тканин та їх очищення від інших клітинних компонентів, та методами аналізу рекомбінантних білків.

Завдання

1. надати базові знання про рослинні системи, як платформу для біофармінгу;
2. ознайомити з основними складовими компонентами експресійних касет та методами клонування цільових генів у рослинні векторні конструкції з метою отримання рекомбінантних білків;
3. ознайомити зі шляхами введення генетичних векторних конструкцій з цільовими трансгенами в рослинні клітини;
4. ознайомити з факторами, які впливають на накопичення рекомбінантних білків у рослинних системах, та способами для підвищення кінцевого вмісту цільових білків;
5. ознайомити з методами виділення білків із рослинних тканин та визначення їх концентрації у рослинному екстракті;
6. ознайомити з методами очищення цільових рекомбінантних білків від власних білків та інших компонентів рослинних клітин;
7. ознайомити з основними методами аналізу білків;
8. ознайомити з базовим лабораторним обладнанням та приладами, необхідними для роботи з білками;
9. навчити виділяти (екстрагувати) білки із рослинних тканин та визначати концентрацію розчинних білків у рослинних екстрактах (практичне заняття).

В результаті вивчення навчальної дисципліни аспірант повинен **знати:**

- переваги і недоліки рослинних систем як платформи для отримання рекомбінантних білків (біофармінгу);

- основні способи отримання рекомбінантних білків у рослинних системах;
- призначення складових компонентів експресійних касет та способи створення рослинних експресійних векторних конструкцій;
- способи введення генетичних векторних конструкцій у рослинні клітини;
- фактори, які впливають на накопичення рекомбінантних білків, та можливі способи збільшення виходу цільових рекомбінантних білків;
- способи виділення цільових білків із рослинних тканин та способи їх очищення від супутніх компонентів рослинної клітини, включаючи власних білків;
- основні аналітичні методи для якісного та кількісного визначення цільових білків в рослинному екстракті;
- базове лабораторне обладнання та прилади, необхідні для роботи з білками.

вміти:

- самостійно оцінювати доцільність використання того чи іншого методу виділення, очищення та аналізу при роботі з конкретними цільовими рекомбінантними білками;
- розраховувати концентрації речовин;
- екстрагувати білки із рослинних тканин та визначати концентрації розчинних білків (включаючи приготування необхідних розчинів та використання потрібного лабораторного обладнання).

володіти:

- навичками пошуку потрібної інформації за темою навчального курсу в загальнодоступних джерелах мережі Інтернет;
- навичками самостійного опрацювання та критичного аналізу наукової та навчально-методичної літератури, пов'язаною з темою навчального курсу

Місце дисципліни.

Навчальна дисципліна «Біофармінг в рослинних системах: методи отримання, виділення та аналізу рекомбінантних білків» є навчальною дисципліною за вибором аспірантів програми підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія» за профілями підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія», «Радіобіологія».

Дисципліна висвітлює сучасні уявлення про отримання цільових рекомбінантних білків у гетерологічних експресійних системах, зокрема у рослинних системах («біофармінг»); методи створення генетичних векторних конструкцій для експресії цільових трансгенів та методи перенесення векторних конструкцій в рослинні клітини; методи продукції, виділення та очищення рекомбінантних білків із рослинних клітин; та методи аналізу цільових рекомбінантних білків.

Зв'язок з іншими дисциплінами.

Навчальна дисципліна «Біофармінг в рослинних системах: методи отримання, виділення та аналізу рекомбінантних білків» є дисципліною за вибором аспірантів для засвоєння знань та вмінь у системі професійної

підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія та біохімія і безпосередньо пов'язана з обов'язковими та вибірковими навчальними дисциплінами, що викладаються на першому та другому курсі аспірантури, а саме такими як «Клітинна та генетична інженерія рослин», «Генетичні основи біотехнології», «Молекулярне клонування, експресія гетерологічних генів та продукція рекомбінантних білків в рослинних системах» та «Механізми регуляції експресії генів в еукаріотичних клітинах та їх застосування в сучасній біотехнології».

ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

Змістовий модуль 1. Біофармінг. Створення генетичних векторних конструкцій для отримання цільових рекомбінантних білків. (26 годин)

Тема 1. Загальні поняття про рекомбінантні білки та сучасні експресійні системи для їх продукції. Біофармінг у рослинних системах. (6 годин)

Основні поняття про біотехнологію, рекомбінантні (гетерологічні) гени (трансгени) та білки. Сучасні експресійні системи для отримання рекомбінантних білків. Переваги та недоліки традиційних експресійних систем (бактеріальні клітини, клітини ссавців) для продукції цільових білків. Інші експресійні системи. Рослинні системи експресії: структурні, фізіологічні та біохімічні особливості рослинних клітин. Переваги та недоліки рослинних систем для продукції цільових рекомбінантних білків. Рослинні вакцинні препарати.

Продукція рекомбінантних білків через стабільну (ядерну, пластомну) та транз'єнтну експресію трансгенів. Біофармінг у рослинних системах *in vivo* та *in vitro*. Шляхи введення трансгенів у рослинні клітини. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація та трансфекція рослин. Фактори, які впливають на вміст цільових білків. Деградація цільових білків, рослинні протеази.

Тема 2. Створення плазмідних генетичних векторних конструкцій, перенесення їх в бактеріальні клітини та перевірка їх функціональної активності для подальшого отримання рекомбінантних білків у рослинних системах. (20 годин)

Генетичні векторні конструкції для експресії трансгенів у рослинних системах. Генетичні векторні конструкції на основі геномів фітопатогенних вірусів. Цільові та селективні гени. Промотори, термінатори, нетрансльовані послідовності, сигнальні та тегові послідовності. Оптимізація кодонів.

Критерії вибору генетичних векторних систем. Дизайн та створення генетичних векторних конструкцій для експресії цільових генів. Вплив складових елементів експресійних касет на експресію трансгенів та кінцевий вміст цільових рекомбінантних білків. Синтез та введення цільових генів у рослинні векторні конструкції: олігонуклеотидні праймери та сайти рестрикції. Виділення рослинних мРНК та синтез кДНК. Комп'ютерні програми та

Інтернет-ресурси для підбору оптимальних праймерів. Внесення модифікацій у нуклеотидні послідовності. Ферменти для молекулярного клонування: рестрикційні ендонуклеази, високоточні полімерази, лігази, комерційні набори.

Перенесення плазмідних генетичних векторних конструкцій у бактеріальні клітини *Escherichia coli*: метод теплового шоку. Виділення плазмідних векторних конструкцій із бактеріальних клітин. Способи перевірки перенесених генетичних конструкцій: ПЛР та електрофоретичне розділення отриманих ПЛР продуктів, рестрикція, секвенування. Хибні результати та можливі способи їх уникнення. Перенесення генетичних векторних конструкцій у бактеріальні клітини *Agrobacterium tumefaciens* та *Rhizobium rhizogenes*: методи хімічної трансформації та електропорації.

Agrobacterium-опосередкована транзйентна експресія трансгенів як метод первинної оцінки функціональної активності та ефективності створених генетичних конструкцій. Трансформація модельних видів рослин. Виділення геномної ДНК із рослинного матеріалу та перевірка наявності цільового трансгена.

Змістовий модуль 2. Продукція цільових рекомбінантних білків у рослинних системах. Методи виділення, очищення та аналізу цільових білків. (34 години)

Тема 3. Накопичення, виділення та очищення рекомбінантних білків, отриманих у рослинних системах. (14 годин)

Сайленсинг (замовчування) трансгенів: можливі шляхи подолання. Деградація (гідролітичне розщеплення) чужорідних білків у рослинних клітинах, протеоліз. Рослинні протеази, інгібітори протеаз. Компарменталізація цільових білків, як метод перешкоджання деградації білків. Оптимізація умов для збільшення вмісту рекомбінантних білків у рослинних системах: вибір оптимальної системи для продукції білків, вибір виду рослини-господаря, вплив фізіологічних рослинних факторів, підбір умов культивування (фізичні та хімічні фактори).

Навіщо потрібно очищувати білки? Загальні принципи поводження з білковими препаратами. Вибір стратегії при очищенні білків. Буферні розчини для екстракції цільових білків із рослинних клітин. Складові компоненти екстракційних буферів та їх призначення. Методи «зеленої екстракції» для отримання білків. Отримання грубого (неочищеного) екстракту рослинних білків: механічне руйнування клітин. Первинна очистка розчинної білкової фракції рослинних зразків: високошвидкісне центрифугування та фільтрація.

Осадження білків сульфатом амонію та ацетоном. Діаліз білків. Концентрація білків шляхом ультрафільтрації, концентраційні колонки. Інші методи очищення білків. Переваги, недоліки методів. Ліофілізація рослинного матеріалу. Визначення чистоти цільового білка. Стабілізація білків.

Принцип хроматографії. Стаціонарна та мобільна фази. Види хроматографії. Гель-фільтрація. Колонкова та високоефективна рідинна хроматографії. Хроматографічні колонки. Сорбенти. Іонообмінна, гідрофобна та афінна хроматографія. Оцінка чистоти цільового білка, сумарна таблиця очищення.

Тема 4. Аналітичні методи дослідження для виявлення присутності та активності цільового білка в рослинних тканинах. **(20 годин)**

Електрофоретичне розділення білків в ПААГ. Принципи та методи розділення. Переваги та недоліки методу. Електрофорез у нативних та денатуруючих умовах. Обладнання, реагенти та розчини для проведення електрофорезу. Підготовка зразків для розділення в ПААГ. Етапи проведення електрофорезу. Виявлення та аналіз білкових смуг, визначення молекулярної маси білків після розділення в ПААГ. Двовимірний гель-електрофорез білків. Елюція білків із гелю. Програмне забезпечення ImageJ для оцінки вмісту цільового білка.

Принципи дот блоту, вестерн блоту та ІФА. Мембрани для блотів. Види ІФА. Переваги та недоліки методів. Обладнання, реагенти та розчини. Первинні та вторинні антитіла. Мітки антитіл. Етапи проведення вестерн блот аналізу та ІФА. Аналіз отриманих результатів.

Визначення концентрації білків за допомогою УФ спектрофотометрії. Метод Бредфорда: переваги та недоліки метода. Інші методи підрахунку кількості білка.

Фізіологічна (ферментативна) активність. GFP та модифікації, GUS. Спектрофотометричний аналіз антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, каталази) у рослинах.

**СТРУКТУРА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
ТЕМАТИЧНИЙ ПЛАН ЛЕКЦІЙ, СЕМІНАРІВ,
ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ, САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ**

№ з/п	Назва	Кількість годин			
		лекції	семінари	практичні	самостійна робота
Змістовий модуль 1 Біофармінг. Створення генетичних векторних конструкцій для отримання цільових рекомбінантних білків.					
1	Тема 1. Загальні поняття про рекомбінантні білки та сучасні експресійні системи для їх продукції. Біофармінг у рослинних системах.	4	-	-	2
2	Тема 2. Створення плазмідних генетичних векторних конструкцій, перенесення їх в бактеріальні клітини та перевірка їх функціональної активності для подальшого отримання рекомбінантних білків у рослинних системах.	10	2	2	6
Разом за змістовим модулем 1		14	2	2	8
Змістовий модуль 2 Продукція цільових рекомбінантних білків у рослинних системах. Методи виділення, очищення та аналізу цільових білків.					
3	Тема 3. Накопичення, виділення та очищення рекомбінантних білків, отриманих у рослинних системах.	8	2	-	4
4	Тема 4. Аналітичні методи дослідження для виявлення присутності та активності цільового білка в рослинних тканинах.	8	2	2	8
Разом за змістовим модулем 2		16	4	2	12
ВСЬОГО		30	6	4	20
ЗАГАЛОМ		60			

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 1

БІОФАРМІНГ. СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ ВЕКТОРНИХ КОНСТРУКЦІЙ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ЦІЛЬОВИХ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ

ТЕМА 1. Загальні поняття про рекомбінантні білки та сучасні експресійні системи для їх продукції. Біофармінг у рослинних системах. (6 годин)

Лекція 1. Загальні поняття про рекомбінантні білки та сучасні експресійні системи для їх продукції. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1 година) опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [1-5, 42-45]

Лекція 2. Біофармінг у рослинних системах. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1 година) опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [3, 6-8, 46-48]

ТЕМА 2. Створення плазмідних генетичних векторних конструкцій, перенесення їх в бактеріальні клітини та перевірка їх функціональної активності для подальшого отримання рекомбінантних білків у рослинних системах. (20 годин)

Лекція 3. Складові елементи експресійних касет. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1 година) опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [2, 10-13, 26 (с. 240-254), 49-53]

Лекція 4. Клонування трансгенів у рослинні експресійні векторні конструкції. Частина 1. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1 години) опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [14, 54]

Лекція 5. Клонування трансгенів у рослинні експресійні векторні конструкції. Частина 2. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1,5 години) підібрати оптимальні пари праймерів для заданої генетичної послідовності, використовуючи комп'ютерні програми та Інтернет-ресурси для підбору оптимальних праймерів; використовуючи комп'ютерні програми визначити очікувані довжини фрагментів в результаті гідролітичного розщеплення векторної конструкції заданими рестрикційними ендонуклеазами.

Рекомендована література: [Комп'ютерні програми та Інтернет-ресурси: BLAST, ApE; 14, 54]

Лекція 6. Перенесення плазмідних генетичних векторних конструкцій у бактеріальні клітини. (2 години)

Практичне зайняття (2 години): Виділення плазмідних векторних конструкцій із бактеріальних клітин.

Завдання для самостійної роботи (1,5 години) визначити довжину ПЛР продукту (п.н.) після електрофоретичного розділення фрагментів в агарозному гелі; опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [15-17, 55-59]

Лекція 7. Перевірка функціональної активності та ефективності створених генетичних конструкцій. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1 година) опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [7, 18-20, 60-62]

Семінар 1 (теми 1 та 2) (2 години): обговорення проблемних питань, що стосуються тем лекційних занять, перевірка завдань для самостійної роботи, підготовка до змістовного модулю.

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 2

ПРОДУКЦІЯ ЦІЛЬОВИХ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ У РОСЛИННИХ СИСТЕМАХ. МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ, ОЧИЩЕННЯ ТА АНАЛІЗУ ЦІЛЬОВИХ БІЛКІВ

ТЕМА 3. Накопичення, виділення та очищення рекомбінантних білків, отриманих у рослинних системах. (14 годин)

Лекція 8. Оптимізація умов для збільшення продукції рекомбінантних білків у рослинних системах. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1 година) опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [8, 21-25, 63-71]

Лекція 9. Виділення та первинне очищення сумарної фракції білків. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1 година) опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [5, 26 (с. 10-19), 27-29, 72-74]

Лекція 10. Очищення цільових білків від супутніх білків, концентрація та стабілізація білків. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1 година) опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [9, 26 (с. 104-118, 121-127, 332-342, 677-686), 29-31, 75-80]

Лекція 11. Хроматографічні методи для очищення та аналізу білків. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1 година) опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [26 (с. 29-34, 98-102, 349-370, 373-384, 406-413, 417-433, 440-467, 685-686), 32-34, 81]

Семинар 2 (теми 3) (2 години): обговорення проблемних питань, що стосуються теми лекційних занять.

ТЕМА 4. Аналітичні методи дослідження для виявлення присутності та активності цільового білка в рослинних тканинах. (20 годин)

Лекція 12. Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі (ПААГ). (2 години)

Завдання для самостійної роботи (3 години) визначити молекулярну масу цільового білка після електрофоретичного розділення сумарних білків рослинного екстракту в ПААГ з використанням стандартних білків з відомою молекулярною масою; оцінити вміст цільового білка після розділення в ПААГ з використанням програми ImageJ; опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [26 (с. 498-512, 542-551, 516-538, 565-571, 681-684), 35, 82-83]

Лекція 13. Дот блот, вестерн блот та імуноферментний аналіз. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (2 години) розрахувати вміст цільового білка в екстракті рослин виявленого методом ІФА з використанням розведень стандартного білка з відомою концентрацією; опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [26 (с. 574-598), 36, 84-86]

Лекція 14. Спектрофотометричні та калориметричні методи визначення концентрації білків. (2 години)

Практичне заняття (2 години): визначення вмісту сумарних розчинних білків за методом Бредфорда та за допомогою УФ спектрофотометрії

Завдання для самостійної роботи (2 години) розрахувати сумарний вміст розчинних білків в екстракті рослин, визначеного за допомогою метода Бредфорду з використанням розведень стандартного білка з відомою концентрацією; опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [26 (с. 74-94), 37-38]

Лекція 15. Методи визначення активності цільових білків. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (1 година) опрацювання навчальної та наукової літератури, що стосується теми лекції.

Рекомендована література: [39-41, 87-89]

Семінарське заняття 3 (тема 4) (2 години): обговорення проблемних питань, що стосуються теми лекцій, перевірка завдань для самостійної роботи, підготовка до змістовного модулю.

КОНТРОЛЬ ЗНАНЬ І РОЗПОДІЛ БАЛІВ, ЯКІ ОТРИМУЮТЬ ЗДОБУВАЧІ

Контроль здійснюється за модульно-рейтинговою системою. У змістовий модуль 1 входять теми 1 та 2, у змістовий модуль 2 – теми 3 та 4. Види контролю - поточний і підсумковий. Поточний контроль здійснюється під час проведення навчальних занять і має на меті регулярну перевірку засвоєння слухачами навчального матеріалу. Форми проведення поточного контролю під час навчальних занять: усне опитування, тестовий контроль, самооцінювання, перевірка практичних навичок.

Оцінювання за формами поточного контролю:

Максимальна кількість балів	Змістовий модуль 1		Змістовий модуль 2		Залік	Підсумкова оцінка
	Поточний контроль	Тест 1	Поточний контроль	Тест 2		
	10	20	10	30	30	100
Сума	30		40		30	100

Для аспірантів, які набрали за результатами контролю у двох змістових модулях сумарно меншу кількість балів, ніж критичний мінімум 40 балів, проходження додаткового тестування є обов'язковим для допуску до заліку. Загальна оцінка за вивчення курсу складається із суми оцінок, отриманих при поточному контролі, та оцінки, отриманої на заліку.

Шкала оцінювання академічної успішності аспіранта

Рівень досягнень (бали за освітню діяльність)	Оцінка ЄКТС/ECTS	Оцінка за національною шкалою (National grade)
90 – 100	A	відмінно (Excellent)
75 – 89	B	добре (Good)
60 – 74	C	задовільно (Satisfactory)
1 – 59	D	незадовільно (Fail)

Методи навчання Пояснювально-ілюстративні, частково-пошукові, дослідницькі.

Технічні засоби навчання Проектор мультимедійний; ноутбук.

Матеріальне забезпечення дисципліни Аудиторії, лабораторні приміщення відділу генетичної інженерії.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна література

1. Tripathi NK, Shrivastava A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Proces Development. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 7:420. doi: 10.3389/fbioe.2019.00420
2. Sethi L, Kumari K, Dey N. Engineering of Plants for Efficient Production of Therapeutics. *Mol Biotechnol.* 2021 63(12):1125-1137. doi: 10.1007/s12033-021-00381-0
3. Fahad S., Khan F.A., Pandupuspitasari N.S. *et al.* Recent developments in therapeutic protein expression technologies in plants. *Biotechnol Lett* 37, 265–279 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1699-7>
4. Heribert Warzecha (2008) Biopharmaceuticals from Plants: A Multitude of Options for Posttranslational Modifications, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25:1, 315-330, DOI: 10.5661/bger-25-315
5. Venkataraman S, Khan I, Habibi P, Le M, Lippert R, Hefferon K. Recent advances in expression and purification strategies for plant made vaccines. *Front Plant Sci.* 2023 14:1273958. doi: 10.3389/fpls.2023.1273958
6. Buyel JF. Plant Molecular Farming - Integration and Exploitation of Side Streams to Achieve Sustainable Biomanufacturing. *Front Plant Sci.* 2019 9:1893. doi: 10.3389/fpls.2018.01893.
7. Nosaki S, Hoshikawa K, Ezura H, Miura K. Transient protein expression systems in plants and their applications. *Plant Biotechnol (Tokyo).* 2021 38(3):297-304. doi: 10.5511/plantbiotechnology.21.0610a.
8. Feng Z, Li X, Fan B, Zhu C, Chen Z. Maximizing the Production of Recombinant Proteins in Plants: From Transcription to Protein Stability. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23(21):13516. <https://doi.org/10.3390/ijms232113516>
9. Coates RJ, Young MT, Scofield S. Optimising expression and extraction of recombinant proteins in plants. *Front Plant Sci.* 2022 13:1074531. doi: 10.3389/fpls.2022.1074531.
10. Claudine Porta & George P. Lomonosoff (2002) Viruses as Vectors for the Expression of Foreign Sequences in Plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 19:1, 245-292, DOI: 10.1080/02648725.2002.10648031
11. Tian C, Zhang Y, Li J, Wang Y. Benchmarking Intrinsic Promoters and Terminators for Plant Synthetic Biology Research. *Biodes Res.* 2022 2022:9834989. doi: 10.34133/2022/9834989.
12. F de Felippes F, McHale M, Doran RL, Roden S, Eamens AL, Finnegan EJ, Waterhouse PM. The key role of terminators on the expression and post-transcriptional gene silencing of transgenes. *Plant J.* 2020 104(1):96-112. doi: 10.1111/tpj.14907
13. Srivastava AK, Lu Y, Zinta G, Lang Z, Zhu JK. UTR-Dependent Control of Gene Expression in Plants. *Trends Plant Sci.* 2018 Mar;23(3):248-259. doi: 10.1016/j.tplants.2017.11.003.

14. Rittié L, Perbal B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J Cell Commun Signal*. 2008. 2(1-2):25-45. doi: 10.1007/s12079-008-0026-2.
15. Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.86491
16. Froger A, Hall JE (2007) Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp* 6:253. doi: 10.3791/253.
17. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016 107(1):1-8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003
18. Gelvin SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 67(1):16-37. doi: 10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003.
19. Li JF., Li L. & Sheen J. Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. *Plant Methods* 6, 1 (2010). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-1>
20. Shreni Agrawal, Esha Rami A Review: *Agrobacterium*-mediated gene transformation to increase plant productivity. *The Journal of Phytopharmacology*. 2022 11(2):111-117 DOI:10.31254/phyto.2022.11211
21. Fagard M, Vaucheret H. (Trans)Gene Silencing in Plants: How Many Mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2000 51:167-194. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.167
22. Thomas EL, van der Hoorn RAL. Ten Prominent Host Proteases in Plant-Pathogen Interactions. *Int J Mol Sci*. 2018 19(2):639. doi: 10.3390/ijms19020639
23. Xia Y. Proteases in pathogenesis and plant defence. *Cell Microbiol*. 2004 6(10):905-13. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00438.x
24. Mangena P. Pleiotropic effects of recombinant protease inhibitors in plants. *Front Plant Sci*. 2022 13:994710. doi: 10.3389/fpls.2022.994710
25. Calvanese E, Gu Y. Towards understanding inner nuclear membrane protein degradation in plants. *J Exp Bot*. 2022 73(8):2266-2274. doi: 10.1093/jxb/erac037
26. *Methods in Enzymology* (2009). Volume 463 <https://www.sciencedirect.com/bookseries/methods-in-enzymology/vol/463/suppl/C>
27. Ahmed K. Rashwan, Ahmed I. Osman, Asem M. Abdelshafy, Jianling Mo & Wei Chen (2023) Plant-based proteins: advanced extraction technologies, interactions, physicochemical and functional properties, food and related applications, and health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI: 10.1080/10408398.2023.2279696
28. Matsushima A, Matsuo K. Removal of plant endogenous proteins from tobacco leaf extract by freeze-thaw treatment for purification of recombinant proteins. *Plant Sci*. 2024 339:111953. doi: 10.1016/j.plantsci.2023.111953
29. Wilken LR, Nikolov ZL. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnol Adv*. 2012 Mar-Apr;30(2):419-33. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.020

30. Du M, Hou Z, Liu L, Xuan Y, Chen X, Fan L, Li Z, Xu B. ¹Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 10:1028691. doi: 10.3389/fbioe.2022.1028691
31. Raynal B, Lenormand P, Baron B, Hoos S, England P. Quality assessment and optimization of purified protein samples: why and how? *Microb Cell Fact.* 2014 13:180. doi: 10.1186/s12934-014-0180-6
32. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanb.* 2016 3(2):156-160. doi: 10.14744/nci.2016.32757.
33. Rushikesh B, Mayur B, Sandip C, Piyush B, Jayesh G, Vijayraj S and Ganesh S. A Brief Review on Different Chromatographic Techniques. *Open Access Journal of Pharmaceutical Research.* 2024. 8(1) DOI: 10.23880/oajpr-16000294
34. Giddings J. Calvin and Keller Roy A. "Chromatography". *Encyclopedia Britannica*, 2024, <https://www.britannica.com/science/chromatography>
35. Garca-Descalzo L., Garca-Lpez E., Alczar A., Baquero F., & Ci C. (2012). Gel Electrophoresis of Proteins. *InTech.* doi: 10.5772/37514
36. Begum H., Murugesan P., & Tangutur A. D. (2022). Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *BioTechniques*, 73(1), 58-69. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0003>
37. Noble JE, Bailey MJ. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 2009; 463:73-95. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1
38. Chang, S.K.C., Zhang, Y. (2017). Protein Analysis. In: Nielsen, S.S. (eds) *Food Analysis. Food Science Text Series.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_18
39. Maureen R. Hanson, Rainer H. Köhler. GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants, *J. Exp. Bot.* 2001. 52(356):529–539. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.356.529>
40. Bhat R.A., Lahaye T. & Panstruga R. The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods* 2, 12 (2006). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-12>
41. Alici E., & Arabaci G. (2016). Determination of SOD, POD, PPO and CAT Enzyme Activities in *Rumex obtusifolius* L. *Annu. Res. Rev. Biol.* 11(3):1-7. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2016/29809>

Додаткова література

42. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014 5:172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
43. Satheeshkumar PK. Expression of Single Chain Variable Fragment (scFv) Molecules in Plants: A Comprehensive Update. *Mol Biotechnol.* 2020 62(3):151-167. doi: 10.1007/s12033-020-00241-3
44. Garenne, D., Haines, M.C., Romantseva, E.F. et al. Cell-free gene expression. *Nat Rev Methods Primers* 1, 49 (2021). <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00046-x>

45. Buyel JF. Product safety aspects of plant molecular farming. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023 11:1238917. doi: 10.3389/fbioe.2023.1238917
46. Sainsbury F, Lomonosoff GP. Transient expressions of synthetic biology in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2014 19(100):1-7. doi: 10.1016/j.pbi.2014.02.003.
47. Sheludko YV, Sindarovska YR, Gerasymenko IM, Bannikova MA, Kuchuk NV (2007) Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotechnol Bioeng* 96:608–614. <https://doi.org/10.1002/bit.21075>
48. Sindarovska Y, Kuchuk M (2021) Long-term potato virus X (PVX)-based transient expression of recombinant GFP protein in *Nicotiana benthamiana* culture in vitro. *Plants (Basel)* 10(10):2187. <https://doi.org/10.3390/plants10102187>
49. Hellens, R.P., Allan, A.C., Friel, E.N. et al. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* 1, 13 (2005). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-13>
50. Wang X, Teng C, Wei H, Liu S, Xuan H, Peng W, Li Q, Hao H, Lyu Q, Lyu S, Fan Y. Development of a set of novel binary expression vectors for plant gene function analysis and genetic transformation. *Front Plant Sci.* 2023 13:1104905. doi: 10.3389/fpls.2022.1104905
51. Jiao, P., Yuan, WY., Zhao, HD. et al. Construction of a new plant expression vector and the development of maize germplasm expressing the *Aspergillus ficuum* phytase gene *PhyA2*. *Genet Resour Crop Evol* 68, 1103–1115 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10722-020-01052-w>
52. Andreas I. Andreou, Jessica Nirikko, Marisol Ochoa-Villarreal, Naomi Nakayama. Mobius Assembly for Plant Systems highlights promoter-terminator interaction in gene regulation. *bioRxiv* 2021.03.31.437819; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.437819>
53. Shingo Nagaya, Kazue Kawamura, Atsuhiko Shinmyo, Ko Kato, The HSP Terminator of *Arabidopsis thaliana* Increases Gene Expression in Plant Cells. *Plant and Cell Physiology.* 51(2):328–332, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp188>
54. Murachelli AG, Damaskos G, Perrakis A. CCD2: design constructs for protein expression, the easy way. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2021 Aug 1;77(Pt 8):992-1000. doi: 10.1107/S2059798321005891
55. Claire Gachon, Annaïck Mingam, Bénédicte Charrier, Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany.* 2004 55(402):1445–1454, <https://doi.org/10.1093/jxb/erh181>
56. Kodackattumannil P, Sasi S, Krishnan S, Lekshmi G, Kottackal M, Amiri KMA. Protocol for the High-quality Plasmid Isolation from Different Recalcitrant Bacterial Species: *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* sp., and *Bacillus thuringiensis*. *Bio Protoc.* 2023 13(15):e4788. doi: 10.21769/BioProtoc.4788.
57. Liu X, Miceli JF III, Patton S, Murray M, Evans J, Wei X, Wang P. *Agrobacterium* Transformation Enhancement by Improved Competent Cell Preparation and Optimized Electroporation. *Life.* 2023; 13(11):2217. <https://doi.org/10.3390/life13112217>

58. Benny A, Alex S, Soni KB, Anith KN, Kiran AG, Viji MM. Improved transformation of *Agrobacterium* assisted by silver nanoparticles. *BioTechnologia (Pozn)*. 2022 103(3):311-317. doi: 10.5114/bta.2022.118673.
59. Juan Manuel Jiménez-Antaño, Josefina Pérez-Vargas, Armando Ariza-Castolo, Octavio Gómez Guzmán, Graciano Calva-Calva. An efficient heat-shock protocol for transformation of *Agrobacterium rhizogenes* without spontaneous generation to antibiotic resistance. *POJ* 11(01):20-29 (2018) doi: 10.21475/poj.11.01.18.pne918
60. Anjanappa RB, Gruissem W. Current progress and challenges in crop genetic transformation. *J Plant Physiol*. 2021 261:153411. doi: 10.1016/j.jplph.2021.153411
61. Sindarovska Y, Kuchuk M. Long-Term Potato Virus X (PVX)-Based Transient Expression of Recombinant GFP Protein in *Nicotiana benthamiana* Culture In Vitro. *Plants*. 2021; 10(10):2187. <https://doi.org/10.3390/plants10102187>
62. Tiwari M, Mishra AK, Chakrabarty D. *Agrobacterium*-mediated gene transfer: recent advancements and layered immunity in plants. *Planta*. 2022. 256(2):37. doi: 10.1007/s00425-022-03951-x.
63. El-Sappah AH, Yan K, Huang Q, Islam MM, Li Q, Wang Y, Khan MS, Zhao X, Mir RR, Li J, El-Tarabily KA, Abbas M. Comprehensive Mechanism of Gene Silencing and Its Role in Plant Growth and Development. *Front Plant Sci*. 2021 12:705249. doi: 10.3389/fpls.2021.705249
64. Holdsworth MJ, Vicente J, Sharma G, Abbas M, Zubrycka A. The plant N-degron pathways of ubiquitin-mediated proteolysis. *J Integr Plant Biol*. 2020 Jan;62(1):70-89. doi: 10.1111/jipb.12882
65. Moloi SJ, Ngara R. The roles of plant proteases and protease inhibitors in drought response: a review. *Front Plant Sci*. 2023 14:1165845. doi: 10.3389/fpls.2023.1165845
66. Sheludko YV, Sindarovska YR, Gerasymenko IM, Bannikova MA, Kuchuk NV (2007) Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotechnol Bioeng* 96:608–614. <https://doi.org/10.1002/bit.21075>
67. Sindarovska YR, Gerasymenko IM, Sheludko YV, Olevinskaya ZM, Spivak NY, Kuchuk NV (2010) Production of human interferon ALPHA 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Cytol. Genet*. 44, 313–316. <https://doi.org/10.3103/S0095452710050099>
68. Sindarovska YR, Golovach IS, Belokurova VB, Gerasymenko IM, Sheludko YV, and Kuchuk NV (2014) Screening of plant cell culture collection for efficient host species for *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Cytol Genet* 48:208–217. <https://doi.org/10.3103/S0095452714040070>
69. Sindarovska YR, Olevinskaya ZM, Demchenko OA, Spivak NY, Kuchuk NV (2019) *Nicotiana cavicola* as a host for production of recombinant proteins by *Agrobacterium*-mediated transient gene expression. *Biopolym Cell* 35(5):340–348. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A11>

70. Sindarovska Y, Kuchuk M (2023) Viral-based expression cassettes ensure high level production of recombinant green fluorescent protein (GFP) in sweet basil (*Ocimum basilicum*) plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 154:121–130. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02516-4>
71. Johannes Buyel & Rainer Fischer (2013) Processing heterogeneous biomass: Overcoming the hurdles in model building. *Bioengineered* 4(1):21-24, DOI: 10.4161/bioe.21671
72. Ponphaiboon J, Krongrawa W, Aung WW, Chinatangkul N, Limmatvapirat S, Limmatvapirat C. Advances in Natural Product Extraction Techniques, Electrospun Fiber Fabrication, and the Integration of Experimental Design: A Comprehensive Review. *Molecules*. 2023; 28(13):5163. <https://doi.org/10.3390/molecules28135163> (увага на методи, які підходять для рослин)
73. Gupta, Ankit & NARANIWAL, MADHU & Kothari, Vijay. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*. 1(1):8-26
74. Usman M, Nakagawa M, Cheng S. Emerging Trends in Green Extraction Techniques for Bioactive Natural Products. *Processes*. 2023; 11(12):3444. <https://doi.org/10.3390/pr11123444>
75. Faye L, Grünwald-Gruber C, Vezina LP, Gomord V, Morel B. A fast and easy one-step purification strategy for plant-made antibodies using Protein A magnetic beads. *Front Plant Sci*. 2024 14:1276148. doi: 10.3389/fpls.2023.1276148
76. Park SR, Lim CY, Kim DS, Ko K. Optimization of Ammonium Sulfate Concentration for Purification of Colorectal Cancer Vaccine Candidate Recombinant Protein GA733-FcK Isolated from Plants. *Front Plant Sci*. 2015 6:1040. doi: 10.3389/fpls.2015.01040.
77. <https://www.sigmaaldrich.com/SE/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-lysis-and-extraction/precipitation-procedures>
78. Jutras PV, Grosse-Holz F, Kaschani F, Kaiser M, Michaud D, van der Hoorn RAL. Activity-based proteomics reveals nine target proteases for the recombinant protein-stabilizing inhibitor SlcYS8 in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnol J*. 2019 17(8):1670-1678. doi: 10.1111/pbi.13092.
79. Hehle VK, Paul MJ, Roberts VA, van Dolleweerd CJ, Ma JK. Site-targeted mutagenesis for stabilization of recombinant monoclonal antibody expressed in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *FASEB J*. 2016 30(4):1590-8. doi: 10.1096/fj.15-283226.
80. Bhatta S, Stevanovic Janezic T, Ratti C. Freeze-Drying of Plant-Based Foods. *Foods*. 2020; 9(1):87. <https://doi.org/10.3390/foods9010087>
81. Ismail, B.P. (2017). Basic Principles of Chromatography. In: Nielsen, S.S. (eds) *Food Analysis*. Food Science Text Series. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_18
82. Eubel H, Braun HP, Millar AH. Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods*. 2005 1(1):11. doi: 10.1186/1746-4811-1-11.

83. Kristi DeCourcy. Protein Electrophoresis Kit. Information Manual. Fralin Life Sciences Institute, Virginia Tech 2019. 64 p.
84. Liu D, Wu H, Cui S, Zhao Q. Comprehensive Optimization of Western Blotting. *Gels*. 2023; 9(8):652. <https://doi.org/10.3390/gels9080652>
85. Liu W, Meng L, Liu X, Liu C, Jin W. Establishment of an ELISA Method for Quantitative Detection of PAT/pat in GM Crops. *Agriculture*. 2022; 12(9):1400. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091400>
86. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, Morimoto S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med*. 2018 72(1):32-42. doi: 10.1007/s11418-017-1144-z
87. Plant Stress Tolerance. *Methods and Protocols Plant Stress Tolerance. Methods and Protocols*. Edited by Ramanjulu Sunkar. 386 с. (вибрані розділи): с. 273-280
88. Dedow LK, Oren E, Braybrook SA. Fake news blues: A GUS staining protocol to reduce false-negative data. *Plant Direct*. 2022 Feb 14;6(2):e367. doi: 10.1002/pld3.367.
89. Sarker U., Oba S. Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. *Sci Rep* 8, 16496 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34944-0>