

Ю.С. ЛУЧАКИВСКАЯ¹, З.М. ОЛЕВИНСКАЯ²,
Е.М. КИЩЕНКО¹, Н.Я. СПИВАК², Н.В. КУЧУК¹

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

² Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
НАН Украины, Киев

E-mail: yu.luchakivskaya@gmail.com

ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ «БОРОДАТЫХ» КОРНЕЙ, КАЛЛУСНЫХ И СУСПЕНЗИОННЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA* L.), СПОСОБНЫХ ЭКСПРЕССИРОВАТЬ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ ИНТЕРФЕРОН АЛЬФА-2b



Описано получение суспензионных, каллусных и корневых культур, иницированных из растений моркови сортов Нантская и Перфекция, которые согласно предыдущим исследованиям характеризовались наиболее высоким уровнем содержания рекомбинантного белка человеческого интерферона альфа-2b и проявляли наиболее высокую антивирусную активность белковых экстрактов (до $12,8 \cdot 10^3$ МЕ/мг СРБ). Антивирусная активность экстрактов каллусных образований была значительно ниже по сравнению с активностью растительных экстрактов исходных организмов. Однако уровень антивирусной активности экстрактов суспензионных культур (до $11,42 \cdot 10^3$ МЕ/мг СРБ) и экстрактов Ri-корней (до $8,40 \cdot 10^3$ МЕ/мг СРБ) был сопоставимым с аналогичными показателями антивирусной активности рекомбинантного белка листьев трансгенных растений моркови, что свидетельствует о возможности использования описанных культур для относительно быстрого получения рекомбинантного терапевтического белка при лечении и профилактике заболеваний вирусной природы.

© Ю.С. ЛУЧАКИВСКАЯ, З.М. ОЛЕВИНСКАЯ,
Е.М. КИЩЕНКО, Н.Я. СПИВАК, Н.В. КУЧУК, 2012

Введение. Невысокая себестоимость культивирования, отсутствие необходимости осуществления дополнительных посттрансляционных модификаций, безопасность применения позволяют успешно использовать растительные системы в качестве биореакторов для получения фармацевтических белков. По сравнению с интактными растениями, к минусам которых можно отнести низкую урожайность, длительный период наращивания биомассы, генетическую и биосинтетическую нестабильность продуцируемого материала, снижение экспрессии за счет системного молчания генов, экологическую угрозу распространения ГМО и особенности переработки и хранения сырья [1], основным преимуществом использования растительной клеточной культуры *in vitro* являются: 1) возможность постоянного и стабильного накопления биомассы путем контроля условий окружающей среды [2]; 2) быстрое накапливание рекомбинантных белков, поскольку клеточная культура способна к значительно более быстрым темпам размножения [3, 4]; 3) более простые и дешевые схемы очистки желаемого продукта [5]. В ряде работ показана возможность использования суспензионных и каллусных растительных культур для получения рекомбинантных фармацевтических белков: бриодина-1 и бриодин-производного одноцепочечного иммунотоксина [6], человеческого альфа-1-антитрипсина [7] в суспензионных культурах табака, человеческого альбумина в суспензионной культуре риса [8], карциноэмбрионного антигена scFvT84.66 в каллусной культуре риса [8] и др. Для продукции глюкоцереброзидазы, альфагалактозидазы, ацетилхолинстеразы, противоопухолевого некротозогенного фактора предлагают использовать суспензионные культуры моркови (www.protalix.com).

Вместе с тем культуру недифференцированных растительных клеток отличает высокий уровень генетической нестабильности и, как следствие, снижение экспрессии трансгенов в длительно культивируемых трансгенных клеточных линиях [10–13].

Одной из наиболее удачных с точки зрения биотехнологии альтернативной растительной системой является культура «бородатых» корней, преимуществами использования которой является быстрый рост, длительная генетическая и синтетическая стабильность [14], возможность синтеза тех же веществ, что и в корнях трансгенных растений [15]. Технология использования «бородатых» корней для продуцирования фармацевтических препаратов получает все большее распространение: немецкая компания «ROOTec» специализируется на получении ценных метаболитов камптотетина и подофилотоксина на основе корневой культуры; кроме того, культуру «бородатых» корней предлагают использовать для фиторемедиации, а также для продуцирования рекомбинантных белков [16, 17]. На сегодняшний день показана возможность получения моноклональных антител IgG₁ (до 1,8 % СРБ) [18], анти-ВИЧ циановирин-*N* (до 0,64 мкг/мл среды) [19], SEAP (secreted alkaline phosphatase) [21, 20] с помощью культуры «бородатых» корней табака *Nicotiana tabacum* L.

Представленная работа описывает получение суспензионных, каллусных и корневых культур, иницированных из растений моркови и способных аккумулировать человеческий интерферон альфа-2b [22]

Материалы и методы. *Растительный материал.* В работе использовали трансгенные растения моркови (*Daucus carota* L.) сортов Нантская и Перфекция, которые согласно предыдущим исследованиям [22] характеризовались наиболее высоким уровнем содержания рекомбинантного белка человеческого интерферона альфа-2b и проявляли наиболее высокую антивирусную активность белковых экстрактов ($6,4-50,7 \cdot 10^3$ МЕ/г сырого веса молодых листьев). Трансгенные растения моркови были получены в результате агробактериальной трансформации (*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101) с использованием векторных конструкций, Т-ДНК район которых содержал ген человеческого лейкоцитарного интерферона альфа-2b, слитого с

растительным кальретикулиновым апопластным сигналом под контролем конститутивного 35S промотора ВМЦК (pCB124) или корнеспецифического *MII* промотора сахарной свеклы (pCB161).

Инициация каллусообразования и культивирование суспензионных культур моркови. Листья моркови стерилизовали согласно общепринятой методике с использованием 40%-ного раствора белизны (2 % гипохлорита натрия). Далее листовые и черешковые экспланты помещали на среду MS [23] с добавлением 2 мг/л регулятора роста Дикамба для инициации каллусообразования, а также селективного антибиотика канамицинсульфата в концентрации 100 мг/л. Через 3–4 нед после появления каллусных образований их переносили в жидкие среды MS с добавлением регулятора роста Дикамба и антибиотика канамицинсульфата в указанных концентрациях либо продолжали культивировать на агаризированных средах, пересаживая каждые 2 нед. Полученные суспензии растительных клеток культивировали на орбитальном шейкере (125 об/мин, 24 °С), пересаживая каждые 2 нед.

Бактериальные штаммы и генетическая трансформация. Для получения культуры трансгенных корней моркови использовали агропиновый А4 штамм *A. rhizogenes*. Бактериальную суспензионную культуру получали в жидкой среде Лурия-Бертани (пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л, рН 7,2) на шейкере (200 об/мин) при температуре 28 °С в течение 24 ч.

Суспензионную бактериальную культуру осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 4 °С), ресуспендировали полученный осадок в жидкой среде MS с половинным содержанием макросолей и добавлением 200 мкМ ацетосирингона и далее культивировали на ротационном шейкере при температуре 28 °С и 200 об/мин в течение 1 ч. Растительные экспланты (асептически культивируемые на среде MS с добавлением 2 мг/л регулятора роста Дикамба листовые и черешковые эксплан-

ты моркови) инкубировали бактериальной суспензией 10–15 мин, промывали стерильной дистиллированной водой. Трансформация проходила на стерильной фильтровальной бумаге в течение 48 ч на рассеянном свете.

В дальнейшем экспланты переносили на агаризированную питательную среду MS с добавлением 100 мг/л канамицина в качестве селективного агента, 500 мг/л цефотаксима для элиминации бактерий. Через 4–6 нед образовавшиеся корневые очаги переносили на безгормональную среду MS с добавлением антибиотиков в указанных концентрациях и культивировали при 24 °С в темноте с интервалом субкультивирования 2–3 нед.

Молекулярно-биологический анализ. Суммарную растительную ДНК экстрагировали согласно рекомендациям Doyle et al. [24]. Для подтверждения трансгенной природы корневой культуры проводили ПЦР-анализ с использованием праймеров 5'-atggatcccaaatgtctattcctctcctccacga-3', 5'-ttaggctctctttcaggttactcagc-3' для идентификации агробактериального гена *rolB* (продукт амплификации 780 п.о.). ПЦР для амплификации фрагмента гена проходила при следующих условиях: денатурация 94 °С/5 мин; 34 цикла (денатурация 94 °С/30 с, отжиг 65 °С/30 с, синтез 72 °С/45 с); заключительный синтез 72 °С/5 мин. Продукты реакции фракционировали в 1%-ном агарозном геле в трис-боратной буферной системе.

Измерение антивирусной активности интерферона. Экстракты каллусных, суспензионных и корневых культур моркови готовили путем растирания растительных тканей в двойном объеме буфера, содержащего 100 мМ Tris HCl, pH 8.0, 5 мМ Na₂ЭДТА, 100 мМ NaCl, 10 мМ меркаптоэтанол с добавлением 2,5 % поливинилпирролидона и последующего центрифугирования (10 000 об/мин в течение 5–7 мин, 4 °С; 15 000 об/мин в течение 25 мин, 4 °С). Для измерения содержания общего растворимого белка в полученных экстрактах исполь-

зовали метод Брэдфорда [25]. Активность интерферона измеряли методом микротитрования [26], основанного на способности изучаемых экстрактов защищать клетки клеточной культуры перевиваемых тестикул поросят (из коллекции Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины) от цитопатического эффекта вируса везикулярного стоматита (штамм «Индиана» из коллекции того же института).

В каждую из 96 лунок платы («Falcon», США) вносили по 0,2 мл взвеси клеток из расчета $2 \cdot 10^5$ клеток/мл. После формирования через 24–48 ч сплошного монослоя исследуемый экстракт (0,2 мл) с последовательным двукратным разведением добавляли в лунки к клеточной культуре. Разведение каждого образца анализировали в трех параллелях. Платы с внесенными препаратами инкубировали в термостате при 37 °С. Через 18–20 ч исследуемые образцы удаляли, а в лунки вносили по 0,1 мл свежей среды для поддержания роста клеток и по 0,1 мл тест-вируса везикулярного стоматита (ВВС) в дозе 100 ТЦД₅₀. Контролем клеток служил сформированный клеточный монослой, к которому добавляли только среду для культивирования, контролем вируса – сформированный клеточный монослой, в который вносили только дозу вируса, используемую в настоящем исследовании.

Подсчет количества выживших клеток проводили после окрашивания их 0,2%-ным раствором красителя Crystal Violet («Sigma», США) в 2%-ном этаноле [27]. Оптическую плотность окрашенных клеток измеряли на спектрофотометре с вертикальным лучом («LabsystemMultiscan», ОК) при длине волны 540 нм. Процент задержки развития цитопатического действия ВВС учитывали по отношению количества живых клеток в лунках, содержащих растительные экстракты, к контрольным, неинфицированным, с учетом уровня развития цитопатического действия ВВС в контроле. На основании полученных данных отмечали разведение образцов, вызывавших 50%-ную задержку

развития цитопатического действия ВВС в культуре клеток [28]. Полученные результаты принимали во внимание только в том случае, если в контрольных культурах, не содержащих вирус, цитодеструктивные изменения отсутствовали, а в контроле вируса наблюдали полную дегенерацию клеток. За титр интерферона принимали максимальное разведение препарата, которое вызывало защиту от цитопатического действия вируса. В качестве положительного контроля использовали стандарт человеческого интерферона альфа ИФН (предоставленный Институтом молекулярной биологии и генетики НАН Украины). Активность интерферона выражали в международных единицах на 1 г сырого веса каллусной, корневой или суспензионной культуры (МЕ/г СВ) или на 1 мг суммарного растворимого белка (МЕ/мг СРБ).

Статистической обработке подвергали данные измерений антивирусной активности интерферона. Аналитические модели, которые демонстрировали среднее значение с доверительными интервалами при $P < 0,05$, считали статистически значимыми. В дальнейшем их использовали для сравнительного анализа. При оценке достоверности сравнения полученных результатов использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. Изучению особенностей инициации и культивирования суспензионных клеточных культур моркови посвящено большое количество исследований последних десятилетий прошлого века, среди которых присутствуют работы, посвященные как собственно условиям культивирования [29–32], так и изучению физиологических и генетических особенностей развития клеточной культуры [33–38]. В нашей работе формирование каллуса наблюдали через 3–4 нед на среде MS с добавлением 2 мг/л регулятора роста Дикамба и селективного антибиотика канамицинсульфата в концентрации 100 мг/л после поверхностной стерилизации черешковых и листовых экс-

плантов. Использование 2,4-Д в качестве регулятора роста [39] в 80 % случаев при проведении наших исследований приводило к образованию бесцветного витрифицированного некомпактного каллуса, для экстрактов которого не отмечали биологической активности при дальнейшем анализе на противовирусную активность. Более того, значительно сниженную антивирусную активность проявляли и суспензионные культуры, которые были иницированы из каллусных культур, полученных с использованием 2,4-Д. Экстракты каллусных образований, иницированных из нетрансгенного растения, не проявляли биологической активности.

Показатели антивирусной активности экстрактов каллусных образований, иницированных из трансформированных с использованием векторных конструкций растений, где ген интерферона находился под контролем конститутивного или корнеспецифического промоторов, достоверно не отличались (табл. 1). Кроме того, биологическая активность упомянутых экстрактов была значительно ниже по сравнению с антивирусной активностью растительных экстрактов, возможно, в результате генетической нестабильности недифференцированного растительного материала [10, 13].

После появления каллусных образований их переносили в жидкие суспензионные среды MS с добавлением регулятора роста Дикамба и антибиотика канамицинсульфата в указанных концентрациях, культивировали на качалке (125 об/мин, 24 °С) в двух вариантах – на свету и в темноте, и пересаживали каждые 2 нед, заменяя питательную среду. Достоверной разницы при оценивании антивирусной активности суспензий растительных клеток, полученных в двух вариантах культивирования, не отмечено. Экстракты суспензионных культур, иницированных из нетрансгенного растения, биологической активности не проявляли. Не наблюдали биологической активности при оценивании антивирусных свойств культу-

рального фильтрата, что свидетельствует о невыведении в среду рекомбинантного белка из клеточных кластеров. Следует отметить, что уровень биологической активности на единицу массы суммарного растворимого белка экстрактов суспензионных культур, иницированных из растений, трансформированных с использованием обеих векторных конструкций (табл. 2), был сопоставимым с аналогичными показателями биологической активности рекомбинантного белка листьев трансгенных растений мор-

кови (средние значения $3,96-5,42 \cdot 10^3$ МЕ/мг СРБ) и достоверно более высоким по отношению к биологической активности экстрактов корнеплодов ($0,89-1,46 \cdot 10^3$ МЕ/мг СРБ) описанных ранее растений [22]. Такие данные дают возможность судить о суспензионной клеточной культуре моркови как о возможном источнике быстрого накопления рекомбинантного белка, который мог бы быть использован для лечения и профилактики заболеваний вирусной природы, однако стоит заметить, что наши исследования,

Таблица 1

Биологическая активность интерферона альфа-2b в каллусных культурах моркови

Показатели	МЕ/мг СРБ	МЕ/г СВ
pCB124 (<i>35S::HuINFα-2b</i>)		
Среднее значение	$2,81 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$
Вариабельность показателя	$0,5 \cdot 10^3-3,1 \cdot 10^3$	$0,93 \cdot 10^3-1,8 \cdot 10^3$
pCB161 (<i>Ml::HuINFα-2b</i>)		
Среднее значение	$2,67 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$
Вариабельность показателя	$0,4 \cdot 10^3-3,9 \cdot 10^3$	$0,84 \cdot 10^3-1,72 \cdot 10^3$

Таблица 2

Биологическая активность интерферона альфа-2b в суспензионных культурах моркови

Показатели	МЕ/мг СРБ	МЕ/г СВ
pCB124 (<i>35S::HuINFα-2b</i>)		
Среднее значение	$5,8 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^3$
Вариабельность показателя	$1,14 \cdot 10^3-11,42 \cdot 10^3$	$0,8 \cdot 10^3-3,5 \cdot 10^3$
pCB161 (<i>Ml::HuINFα-2b</i>)		
Среднее значение	$5,02 \cdot 10^3$	$2,34 \cdot 10^3$
Вариабельность показателя	$2,2 \cdot 10^3-9,8 \cdot 10^3$	$0,84 \cdot 10^3-3,01 \cdot 10^3$

Таблица 3

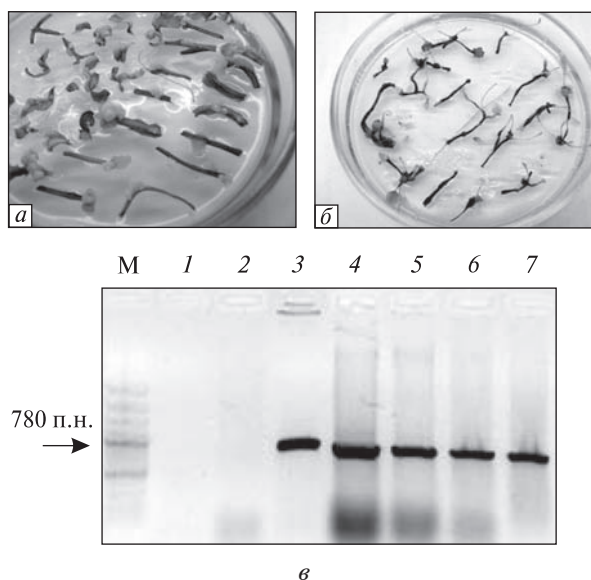
Биологическая активность интерферона альфа-2 в культурах «бородатых» корней моркови

Показатели	МЕ/мг СРБ	МЕ/г СВ
pCB124 (<i>35S::HuINFα-2b</i>)		
Среднее значение	$4,9 \cdot 10^3$	$6,34 \cdot 10^3$
Вариабельность показателя	$3,2 \cdot 10^3-8,4 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^2-12,08 \cdot 10^3$
pCB161 (<i>Ml::HuINFα-2b</i>)		
Среднее значение	$5,02 \cdot 10^3$	$10,2 \cdot 10^3$
Вариабельность показателя	$3,8 \cdot 10^3-8,4 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^3-12,8 \cdot 10^3$

которые не приведены в настоящей статье, свидетельствуют о снижении активности накапливаемого белка после 2,5–3 мес культивирования растительной суспензии, возможно, из-за склонности белка к деградации при длительном накоплении интерферона в растительных тканях [40], либо генетической нестабильности недифференцированного растительного материала [10, 13].

Образование культуры трансгенных корней моркови при обработке эксплантов бактериальной культурой *A. rhizogenes* наблюдали через 4–6 нед на безгормональной среде MS с добавлением антибиотиков в указанных концентрациях при 24 °С в темноте с интервалом субкультивирования 2–3 нед. Полученные корни характеризовались Ri-фенотипом: гормонезависимым ростом, отсутствием геотропизма. Достоверной разницы при оценивании эффективности Ri-корнеобразования для различных сортов и линий, трансформированных с использованием векторных конструкций, где ген интерферона находился под контролем конститутивного и корнеспецифического промоторов, не наблюдали. Контрольные нетрансформированные экспланты были не способны к формированию Ri-корней на описанной среде. ПЦР-анализ позволил выявить присутствие агробактериального гена *rolB* для 95–98 % анализируемых корневых клонов (рисунок), что подтверждает трансгенную природу полученной корневой культуры.

Биологическую активность не наблюдали для экстрактов «бородатых» корней, иницированных из нетрансгенного растения. Показатели антивирусной активности экстрактов Ri-корней, иницированных из растений, трансформированных с использованием векторной конструкции, где ген интерферона находился под контролем корнеспецифического *MII* промотора сахарной свеклы, была достоверно выше, чем в варианте, где ген интерферона находился под контролем конститутивного 35S промотора ВМЦК (табл. 3). Это, возможно, является результатом высокой корнеспецифической ак-



Инициация каллусообразования на черешковых эксплантах моркови (а) и Ri-корнеобразования на черешковых эксплантах (б); в – ПЦР-анализ на присутствие гена *rolB*: М – Маркер (1 kb Plus DNA Ladder, «Fermentas»), 1 – отрицательный контроль (проба без ДНК), 2 – отрицательный контроль (ДНК нетрансформированного растения), 3 – положительный контроль (плазмидная ДНК (A4)), 4–7 – ДНК анализируемых растений моркови

тивности *MII* промотора в культуре «бородатых» корней. Кроме того, уровень биологической активности экстрактов Ri-корней, иницированных из растений, трансформированных с использованием векторной конструкции, где ген интерферона находился под контролем корнеспецифического промотора, был достаточно высоким, сравнимым с показателями биологической активности рекомбинантного белка растительных суспензионных культур и сопоставимым с аналогичными показателями биологической активности рекомбинантного белка листьев и корнеплодов моркови описанных растений [22]. Предполагаем, что такой уровень антивирусной активности экстрактов культуры «бородатых» корней является результатом высокой специфической активности интерферона (10^8 МЕ/мг) и не свидетельствует об уровне его накопления в культуре «бородатых» корней моркови с учетом дан-

ных о накоплении рекомбинантных белков в культуре «бородатых» корней на относительно невысоком уровне [41, 20].

Таким образом, настоящая работа показывает возможность получения клеточных культур и культуры «бородатых» корней моркови, способных экспрессировать человеческий интерферон альфа-2b и обладающих высоким уровнем антивирусной активности. Описанные культуры могли бы быть использованы в качестве источника относительно быстрого получения рекомбинантного терапевтического белка для лечения и профилактики заболеваний вирусной природы.

*Y.S. Luchakivskaya, Z.M. Olevinskaya,
Y.M. Kishchenko, N.Y. Spivak, N.V. Kuchuk*

OBTAINING OF HAIRY-ROOT, CALLUS AND SUSPENSION CARROT CULTURE (*DAUCUS CAROTA* L.) ABLE TO ACCUMULATE HUMAN INTERFERON ALPHA-2b

Here we report the obtaining of suspension, callus and hairy root culture initiated from carrot plants of Nantskaya and Perfektzya variety with the highest level of recombinant human interferon α -2b accumulation exhibited the highest level of plant protein extract antiviral activity (up to $12.8 \cdot 10^3$ IU/mg TSP). The antiviral activity of callus extracts was significantly lower comparing to the activity of plant extracts from parent organisms. However, the antiviral activity level of suspension culture extracts (up to $4.42 \cdot 10^3$ IU/mg TSP) and Ri-root ones (up to $4.42 \cdot 10^3$ IU/mg TSP) appeared to be comparable to analogical data of antiviral activity of transgenic carrot leaf extracts, this way the described cultures could be possibly used for comparatively speedy obtaining of recombinant therapeutic protein for curing and preventing of virus diseases.

*Ю.С. Лучакивська, З.М. Олевинська,
О.М. Кищенко, М.Я. Співак, М.В. Кучук*

ОДЕРЖАННЯ КУЛЬТУРИ «ВОЛОХАТИХ» КОРЕНІВ, КАЛЮСНИХ ТА СУСПЕНЗІЙНИХ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР МОРКВИ (*DAUCUS CAROTA* L.), ЗДАТНИХ ЕКСПРЕСУВАТИ ЛЮДСЬКИЙ ІНТЕРФЕРОН АЛЬФА-2b

Описано отримання суспензійних, калюсних та корневих культур, ініційованих з рослин моркви Нантська та Перфекція, які згідно з попередніми дослідженнями демонстрували найбільш високий рівень вмісту рекомбінантного білка людського інтерферону альфа-2b та найбільш високу анти-

вірусну активність білкових екстрактів (до $12.8 \cdot 10^3$ МО/мг СРБ). Антивірусна активність екстрактів калюсних утворень була значно нижчою порівняно з активністю рослинних екстрактів вихідних організмів. Проте рівень антивірусної активності екстрактів суспензійних культур (до $11,42 \cdot 10^3$ МО/мг СРБ) та екстрактів Ri-коренів (до $8,4 \cdot 10^3$ МО/мг СРБ) був подібним до аналогічних показників антивірусної активності сумарного білка листя трансгенних рослин моркви, що вказує на можливість використання описаних культур для відносно швидкого одержання рекомбінантного терапевтичного білка при лікуванні і профілактиці захворювань вірусної природи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Streatfield S.J., Howard J.A.* Plant-based vaccines // *Int. J. Parasitol.* — 2003. — **33**. — P. 479–493.
2. *Su W.W., Lee K.T.* Plant cell and hairy-root cultures — process characteristics, products, and applications // *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources : New Technologies and Applications / Ed. S.T. Yang.* — New York : Elsevier, 2006. — P. 263–292.
3. *Fischer R., Emans N., Schuster F. et al.* Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2003. — **30**, № 2. — P. 109–112.
4. *Kim T.-G., Kim H.-M., Lee H.-J. et al.* Reduced protease activity in transformed rice cell suspension cultures expressing a proteinase inhibitor // *Prot. Exp. Purif.* — 2007. — **53**, № 2. — P. 270–277.
5. *Shiha Sh.M.-H., Doran P.M.* Foreign protein production using plant cell and organ cultures : Advantages and limitations // *Biotechnol. Adv.* — 2009. — **27**, № 6. — P. 1036–1042.
6. *Francisco J.A., Gawlak S.L., Miller M. et al.* Expression and characterization of bryodin 1 and a bryodin 1-based single-chain immunotoxin from tobacco cell culture // *Bioconjug. Chem.* — 1997. — **8**, № 5. — P. 708–713.
7. *Terashima M., Murai Y., Kawamura M. et al.* Production of functional human alpha 1-anti-trypsin by plant cell culture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1999. — **52**, № 4. — P. 516–523.
8. *Huang L.-F., Liu Y.-K., Lu C.-A. et al.* Production of human serum albumin by sugar starvation induced promoter and rice cell culture // *Transgenic Res.* — 2000. — **14**, № 5. — P. 569–581.
9. *Torres E., Vaquero C., Nicholson L. et al.* Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies // *Transgenic Res.* — 1999. — **8**, № 6. — P. 441–449.

10. Miao Y., Ding Y., Sun Q.Y. et al. Plant bioreactors for pharmaceuticals biotechnology and genetic engineering // Reviews. — 2008. — **25**. — P. 363—380.
11. Carpita N., Sabularse D., Monterzinos D. et al. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells // Science. — 1979. — **205**, № 4411. — P. 1144—1147.
12. Su W.W. Bioreactor engineering for recombinant protein production using plant cell suspension culture. // Plant Tissue Culture Engineering. — 2006. — **6**, Part 2. — P. 135—159.
13. Doran P.M. Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures // Trends Biotechnol. — 2006. — **24**. — P. 426—432.
14. Sivakumar G. Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceutical from plant roots // J. Biotechnol. — 2006. — **1**. — P. 1419—1427.
15. Choi Y.E., Kim Y.S., Paek K.Y. Types and designs of bioreactors for hairy root culture // Plant Tissue Culture Engineering. — 2006. — **6**. — P. 161—172.
16. Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Pati P.K. et al. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects // Curr. Opin. Plant. Biol. — 2006. — **9**. — P. 341—346.
17. Drake P.M.W., Chargelegue D.M., Vine N.D. et al. Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots // Plant Mol. Biol. — 2005. — **52**, № 1. — P. 233—241.
18. Wongsamuth R., Doran P.M. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots // Biotechnol. Bioeng. — 2000. — **54**. — P. 401—415.
19. Ma J.K., Drake P.M., Chargelegue D. et al. Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production // Vaccine. — 2005. — **23**, № 15. — P. 1814—1818.
20. Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Logendra S. et al. Production of recombinant proteins in plant root exudates // Nat. Biotechnol. — 1999. — **17**. — P. 466—469.
21. Gaume A., Komarnytsky S., Borisjuk N.V. et al. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots // Plant. Cell. Rep. — 2009. — **21**, № 12. — P. 1188—1193.
22. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasimenko I. et al. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // Plant Cell Rep. — 2011. — **30**, № 3. — P. 407—415.
23. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**. — P. 473—497.
24. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. — 1990. — **12**. — P. 13—15.
25. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — **72**. — P. 248—254.
26. Rubinstein S., Familletti Ph., Petska S. Convenient assay for interferons // J. Virol. — 1981. — **37**, № 5. — P. 755—758.
27. Medvedev A.E., Fuchs B.B., Rakhmievich A.L. A study of the action of immunosuppressive factors from tumor cells on lymphocytes and macrophages in vitro and on the graft-versus-host reaction in mice // Biomed. Sci. — 1990. — **3**, № 1. — P. 261—266.
28. Доклінічні дослідження лікарських засобів / Під ред. О.В. Стефанова. — Київ, 2001. — 392 с.
29. Dougall D.K., Weyrauch K.W. Abilities of organic acids to support growth and anthocyanin accumulation by suspension cultures of wild carrot cells ammonium as the sole nitrogen source // In Vitro. — 1980. — **16**, № 11. — P. 969—975.
30. Michler Ch.H., Lineberger R.D. Effects of light on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures // Plant Cell Tissue Organ. Culture. — 1987. — **11**. — P. 189—207.
31. Jay V., Genestier S., Courduroux J.-C. Bioreactor studies on the effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota* L.) cell cultures // Plant Cell Rep. — 1992. — **11**. — P. 605—608.
32. Widholm J.M. Carrot cell mutants // Plant Mol. Biol. Rep. — 1984. — **2**, № 3. — P. 45—53.
33. Osuga K., Komamine A. Synchronization of somatic embryogenesis from carrot cells at high frequency as a basis for the mass production of embryos // Plant Cell Tissue Organ. Culture. — 1994. — **39**. — P. 125—135.
34. Komamine A., Murata N., Nomura K. 2004 SIVB Congress symposium proceeding: mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures — morphology, physiology, biochemistry and molecular biology // In Vitro Cell. Dev. Biol. (Plant). — 2005. — **41**. — P. 6—10.
35. Ronchi V.N., Giorgetti L., Tonelli M. et al. Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. 1. Prophase chromosome reduction // Plant Cell Tissue Organ. Culture. — 1992. — **30**. — P. 107—114.
36. Kikuchi A., Satoh Sh., Nakamura N. et al. Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli // Plant Cell Rep. — 1995. — **14**. — P. 279—284.
37. Ducos J.-P., Bollon H., Pettard V. Production of carrot somatic embryos in a bioreactor // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1993. — **39**. — P. 465—470.
38. Thorpe T.A. In vitro Embryogenesis in Plants. — Dordrecht : Kluwer Acad. Publ., 1995. — 486 p.

39. *Fujimura T., Komamine A.* The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture // *New Phytol.* – 1980. – **86**. – P. 213–218.
40. *Leelavathi S., Reddy V.S.* Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors // *Mol. Breed.* – 2003. – **11**. – P. 49–58.
41. *Gleba D., Borisyuk N., Borisyuk L. et al.* Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1999. – **96**. – P. 5973–5977.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МЕ	– международные единицы
СРБ	– суммарный растворимый белок
ВМЦК	– вирус мозаики цветной капусты
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ТЦД	– тканевая цитопатическая доза
ВВС	– вирус везикулярного стоматита
2,4-D	– 2,4-дихлорофеноксиацетатная кислота
СВ	– сырой вес

Поступила 09.06.10