

УДК 57.084.1

ОПТИМИЗАЦИЯ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНЗИТОРНОЙ ЭКСПРЕССИИ ИММУНОЦИТОКИНА НА ОСНОВЕ ИНТЕРФЕРОНА- α -2b ЧЕЛОВЕКА И АНТИТЕЛА ПРОТИВ ОПУХОЛЕВОГО АНТИГЕНА HER2 В *NICOTIANA BENTHAMIANA*

К.М. Коноплина^{1*}, Е.Н. Кособокова¹, Е.В. Шешукова², М.В. Пинюгина¹,
А.А. Мальченкова¹, В.С. Косоруков¹

(¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ; ² ФГУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН; *e-mail: konoplinakm@gmail.com)

Один из способов повышения эффективности транзиторной экспрессии целевого белка в растениях с помощью *Agrobacterium tumefaciens* заключается в оптимизации состава раствора для агроинfiltrации. В настоящей работе методом статистического планирования эксперимента исследовано, как влияет на выход целевого иммуноцитоклина введение в среду для агроинfiltrации некоторых химических добавок. Показано, что ацетосирингон (600 мкМ) и сурфактант Pluronic F-68 (0,2%) существенно повышают выход целевого белка, липоевая кислота (0–5 мкМ) и повидон (0–0,5 г/л) не оказывают значимого влияния на этот показатель, а аскорбиновая кислота в концентрации 25–50 мМ значимо снижает выход. При использовании раствора определенного состава, полученного для агроинfiltrации, выход целевого белка составил более 500 мкг/г, что достаточно для практического получения рекомбинантных белков в растениях.

Ключевые слова: агроинfiltrация, оптимизация экспрессии белка, статистическое планирование эксперимента, транзиторная экспрессия, *Nicotiana benthamiana*.

Растения как система экспрессии сложных гликозилированных гетерологичных белков, в частности терапевтических, представляют потенциальную альтернативу линиям клеток млекопитающих за счет ряда преимуществ, в числе которых отсутствие патогенных для человека микроорганизмов, вирусов, онкогенов и прионов, относительно низкая стоимость и простота масштабирования. Получение в растениях таких сложных белков, как полноразмерные антитела, возможно при стабильной экспрессии в целых растениях, культурах корней и суспензионных культурах клеток, а также при транзиторной экспрессии в целых растениях с помощью вирусных и бактериальных векторов [1–3]. В последние годы большую популярность приобрела транзиторная трансформация методом агроинfiltrации с помощью *Agrobacterium tumefaciens* целых растений табака *Nicotiana benthamiana*, позволяющая в достаточно короткие сроки получить целевой белок в значительном количестве.

В общем случае эффективность *Agrobacterium*-опосредованной транзиторной экспрессии рекомбинантного белка складывается из следующих составляющих:

эффективность трансформации (определяется видом растения-хозяина, его физиологическим состоянием на момент инfiltrации [4, 5]);

вирулентность используемого штамма *Agrobacterium* [5, 6];

совместимость между видом растения и штаммом бактерии [5];

физические факторы окружающей среды (температура, освещение);

химические добавки к среде для агроинfiltrации [5, 6];

накопления целевого белка в растительной клетке (за счет типа экспрессионного вектора, его регуляторных последовательностей, влияющих на уровень экспрессии трансгена [2, 5]);

ингибирование посттранскрипционного сайленсинга гена, например, с помощью коэкспрессии белка p19 [7];

нейтрализация с помощью антиоксидантов активных форм кислорода, образующихся в растительной клетке при агроинfiltrации [8];

сигнальная последовательность, задающая локализацию рекомбинантного белка в растительной клетке;

белковая инженерия – оптимизация химических и биофизических свойств целевого белка, направленная на снижение гидрофобности его доменов, а также удаление сайтов расщепления растительными протеазами [9].

В настоящее время большое внимание уделяется разработке векторных конструкций на основе вирусных геномов. Однако можно существенно увеличить уровень экспрессии также за счет улучшения эффективности агротрансформации, в частности введения химических добавок в среду для инфильтрации.

Так, для повышения частоты трансформации в состав базового раствора для инфильтрации включают ацетосирингон – фенольное соединение, секретируемое растениями в ответ на повреждение растительной клетки, в концентрации, как правило, 100–200 мкМ. Значимость ацетосирингона как компонента среды обусловлена тем, что он индуцирует гены вирулентности в *Agrobacterium*, а также экспрессию малых белков теплового шока HspL, необходимых для накопления белка VirB и VirB/D4-опосредованного переноса Т-ДНК *Agrobacterium* [10, 11].

Нейтральные поверхностно-активные вещества (например, Pluronic F-68, Tween-20, Triton X-100, Silvet L-77) снижают поверхностное натяжение и, предположительно, способствуют проникновению бактерий через устьица в ткани растения, а также могут устранять некоторые вещества, мешающие прикреплению бактерий к растительной клетке [12–14].

Часто причиной снижения экспрессии трансгена становятся либо его метилирование в клетке-хозяине, либо деградация в результате посттранскрипционного сайленсинга. Для решения этих проблем в первом случае можно использовать деметилирующий агент – азациитидин [14], во втором – коэкспрессию подавляющих посттранскрипционный сайленсинг белков, например белка р19 вируса кустистости томатов или белка 2b вируса огуречной мозаики [6, 7].

Активные формы кислорода (АФК), образующиеся во время окислительного стресса, вызванного инвазией патогенов (в лабораторных условиях – инфильтрацией *Agrobacterium*) или каким-либо абиотическим стрессом, могут повреждать растительные клетки и приводить к некрозу. Нейтрализовать АФК и продолжить накопление белка в клетках растений можно с помощью антиоксидантов в составе среды для инфильтрации (например, α -липоевой кислоты, аскорбиновой кислоты и повидона); не-

которые антиоксиданты, такие как глутатион, селенит, α -токоферол и α -липоевая кислота также способствуют повышению частоты трансформации [8].

Биотехнологические процессы характеризуются множеством факторов, влияющих на выходной параметр, например продукцию целевого белка. При наличии нескольких независимых факторов можно изучать их действие на исследуемый объект (параметр) либо по отдельности (однофакторный эксперимент), либо при одновременном варьировании значений этих факторов по заданному плану (многофакторный эксперимент). Первый метод (как более простой) чаще применяется в исследованиях, однако он требует значительных затрат времени и ресурсов, не позволяя получить оптимального решения.

Второй метод (метод статистического планирования эксперимента) дает возможность получения максимального количества информации при проведении небольшого числа экспериментов. Он позволяет определить влияние отдельных факторов, установить наличие в системе межфакторных взаимодействий и оценить роль последних, а также определить значение факторов при оптимальной эффективности процессов [15].

Цель данной работы – оценка влияния ацетосирингона, Pluronic F-68, повидона, липоевой и аскорбиновой кислот в выбранных диапазонах концентраций на продукцию иммуноцитокина в *Nicotiana benthamiana*.

Материалы и методы

Растения, бактериальный штамм. В работе использовали агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101), трансформированные плазмидами тяжелой и легкой цепей иммуноцитокина на основе интерферона- α -2b человека и гуманизированного антитела против опухолевого антигена HER2 [16], а также плазмидой с геном белка р19 из вируса карликовой кустистости томатов для подавления посттранскрипционного сайленсинга трансгена [7]. Растения *Nicotiana benthamiana* культивировали в теплице под биолампами с продолжительностью дня 16 ч при 22 °С и влажности 60%; для инфильтрации использовали 6–8-недельные растения.

Агроинфильтрация. Агробактерии культивировали в течение ночи в 3 мл LB при 28 °С и 180 об/мин с соответствующими антибиоти-

ками (агробактерии с плазмидой либо тяжелой, либо легкой цепи иммуноцитокина: рифампицин (50 мкг/мл), гентамицин (25 мкг/мл), канамицин (50 мкг/мл); агробактерии с плазмидой белка р19: рифампицин (50 мкг/мл), гентамицин (25 мкг/мл), карбенициллин (50 мкг/мл).

В ночной культуре оценивали плотность клеток и рассчитывали количество каждой бактериальной суспензии, необходимое для получения в смеси конечного объема $OD_{600} = 0,1$ е.о.п. Отобранную бактериальную смесь центрифугировали при 12 000 g в течение 5 мин, супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в смеси буфера для агроинъекции (10 mM $MgSO_4$ («Helicon», Россия), 10 mM MES («Helicon», Россия), pH 5,5) и химических добавок: ацетосирингона (200–600 мкМ; «Sigma-Aldrich», США), липоевой кислоты (0–5 мкМ; «Sigma-Aldrich», США), аскорбиновой кислоты (0–50 мМ; «Sigma-Aldrich», США; pH 5,6), Pluronic F-68 (0–0,2%, «Sigma-Aldrich», США), повидона (0–0,5 г/л; «Sigma-Aldrich», США).

Агроинъекцию проводили однократно в три верхних листа двух растений с помощью шприца без иглы. Для минимизации вариабельности, обусловленной физиологией растений, на одном листе инфильтровали контрольную смесь и три экспериментальные [5, 17]. В качестве контроля использовали бактериальную смесь после отмывки центрифугированием, ресуспендированную в буфере для агроинъекции с 200 мкМ ацетосирингона. Нормированное значение выхода определяли как отношение этого показателя, полученного в экспериментальных условиях, к полученному при контрольных условиях.

Экстракция целевого белка из листьев *N. benthamiana* и определение его концентрации. Пробы инфильтрованных участков листьев собирали на третьи сутки после агроинъекции, замораживали в жидком азоте и гомогенизировали

в шести объемах экстракционного буфера – 0,2 М цитрат натрия («Helicon», Россия), 0,005 М ЭДТА («Helicon», Россия), pH 6,0. Полученную смесь инкубировали в течение 30 мин на шейкере при комнатной температуре и далее центрифугировали 15 мин при 14 000 g, супернатант использовали для определения концентрации целевого слитного белка методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для проведения ИФА использовали набор «IgG общий – ИФА» («Вектор Бест», Россия).

Планирование эксперимента и статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Design-Expert 10.0.3 («Stat-Ease», США). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В общем случае условия агроинфильтрации дают значимый вклад в итоговую продуктивность по целевому белку. В настоящей работе исследовали влияние некоторых химических добавок на продукцию иммуноцитокина в *Nicotiana benthamiana* методом статистического планирования эксперимента (табл. 1). Для выявления химических добавок, значимо повышающих выход целевого белка, проводили двухуровневый дробный факторный эксперимент по плану Плакетта–Бермана. Сгенерированный программой Design-Expert 10.0.3 набор экспериментов, а также нормированные значения выходов см. в табл. 2.

Полученная при статистической обработке данных линейная регрессионная модель (в кодированных величинах; табл. 3):

$$Y = 0,91 + 0,14 A - 0,007 B - 0,30 \cdot C + 0,079 D - 0,009 E,$$

где A – ацетосирингон, B – липоевая кислота, C – аскорбиновая кислота, D – Pluronic F-68 (Plu), E – повидон, адекватно описывает данные ($p < 0,0001$); потеря согласия предсказанных моделью

Т а б л и ц а 1

Количественные уровни варьируемых факторов

Фактор	X_{\min}	X_{\max}
Ацетосирингон, мкМ	200	600
Липоевая кислота, мкМ	0	5
Аскорбиновая кислота, мМ	0	50
Pluronic F-68, %	0	0,2
Повидон, г/л	0	0,5

Т а б л и ц а 2

Определенный с помощью программы Design-Expert 10.0.3 набор экспериментов и полученные нормированные выходы

Ацетосирингон, мкМ	Липоевая кислота, мкМ	Аскорбиновая кислота, мМ	Pluronic F-68, %	Повидон, г/л	Нормированное значение выхода
500	3,375	0	0	0,5	1,26
600	5	0	0,2	0,125	1,51
200	5	0	0,2	0,5	1,04
200	5	0	0,2	0,5	1,08
200	0	50	0,2	0	0,52
200	0	0	0	0	0,79
200	0	50	0	0,5	0,42
200	0	50	0	0,5	0,37
600	4	50	0,2	0,5	0,66
600	0	25	0,1	0	1,06
600	5	50	0	0	0,60
600	5	50	0	0	0,69
200	0	50	0,2	0	0,67
200	0	0	0	0	1,06
600	0	0	0,2	0,5	1,50
220	5	40	0,06	0,275	0,72

значений с экспериментальными незначительная ($p = 0,2668$). В результате использования этой статистически значимой линейной модели не выявлено значимых взаимодействий факторов, при этом показано, что на выход иммуноцитоклина значимое положительное влияние оказывает повышение концентраций ацетосирингона (до 600 мкМ) и Pluronic F-68 (до 0,2%), отрицательно влияет аскорбиновая кислота в концентрации 25–50 мМ ($p < 0,05$), тогда как липоевая кислота (0–5 мкМ) и повидон (0–0,5 г/л) в исследуемом диапазоне концентраций не влияют на выход целевого белка (табл. 3, рисунок).

Вышеприведенные диапазоны концентраций ацетосирингона, Pluronic F-68, повидона, липоевой и аскорбиновой кислот мы выбрали на основании результатов работы [6] при введении перечисленных добавок в среду для агроинfiltrации *N. benthamiana*. Полученные нами результаты расходятся с референсными. Так, мы не наблюдали максимальной эффективности ацетосирингона в концентрации 500 мкМ; 5 мкМ липоевой кислоты не оказывали значимого эффекта на выход целевого

белка, как и 5 мМ аскорбиновой кислоты. Авторы работы [6] полагают, что сурфактант Pluronic F-68 дает значимый вклад в повышение продуктивности при концентрации 0,002%, тогда как мы наблюдали максимум эффективности данного ПАВ при концентрации 0,2% – достаточно высокой и, вероятно, токсичной, поскольку при использовании 0,2% Pluronic F-68 в растворе для агроинfiltrации наблюдалось значительное снижение активности репортерного белка β -глюкуронидазы.

Полученные различия можно объяснить тем, что мы использовали другой штамм *A. tumefaciens* и экспрессионный вектор. Ранее разными исследователями было отмечено, что влияние на уровень экспрессии химических добавок к агроинfiltrационному раствору не универсально [5, 6, 18]. В общем случае разница в результатах при использовании одних и тех же веществ в одинаковой концентрации может быть обусловлена выбранным видом растения-хозяина, штаммом *Agrobacterium* и совместимостью этих живых организмов. На результаты влияют также условия культивирования растений, их возраст и

Т а б л и ц а 3

Дисперсионный анализ полученной регрессионной модели

Параметры	Сумма квадратов	Число степеней свободы	Средний квадрат	Критерий Фишера F	p-значение Prob > F
Модель	1,75	5	0,35	24,77	< 0,0001
А – ацетосирингон	0,27	1	0,27	19,11	0,0014
В – липоевая кислота	0,001	1	0,00	0,048	0,8311
С – аскорбиновая кислота	1,21	1	1,21	85,29	< 0,0001
Д – Pluronic F-68	0,082	1	0,082	5,82	0,0365
Е – повидон	0,001	1	0,00	0,067	0,8012
Остатки	0,14	10	0,014		
Потеря согласия	0,091	5	0,018	1,80	0,2668

физиологическое состояние на момент инфильтрации, методика агроинфильтрации, экспрессионный вектор и стабильность используемого репортерного белка (считается, что β -глюкуронидаза более стабильна, чем зеленый флуоресцентный белок GFP). Так, ацетосирингон вне зависимости от свойств используемого растения-хозяина и штамма *Agrobacterium* либо не оказывает значимого влияния на экспрессию репортерного белка [5], либо дает дозозависимый эффект с максимумом при ~450 мкМ [18] и даже 1000 мкМ [19].

В работе [20] использовали липоевую кислоту в целях снижения некроза и повышения частоты агробактериальной стабильной трансформации для сои, пшеницы, хлопка и томата MicroTom. Количество липоевой кислоты в составе среды для трансформации различалось в зависимости от вида растения и стадии трансформации. В наибольшей степени трансформация осуществлялась при содержании липоевой кислоты (мкМ): 250 для сои, 50 для пшеницы, 50 и 100 для хлопка, 5 и 10 для томата.

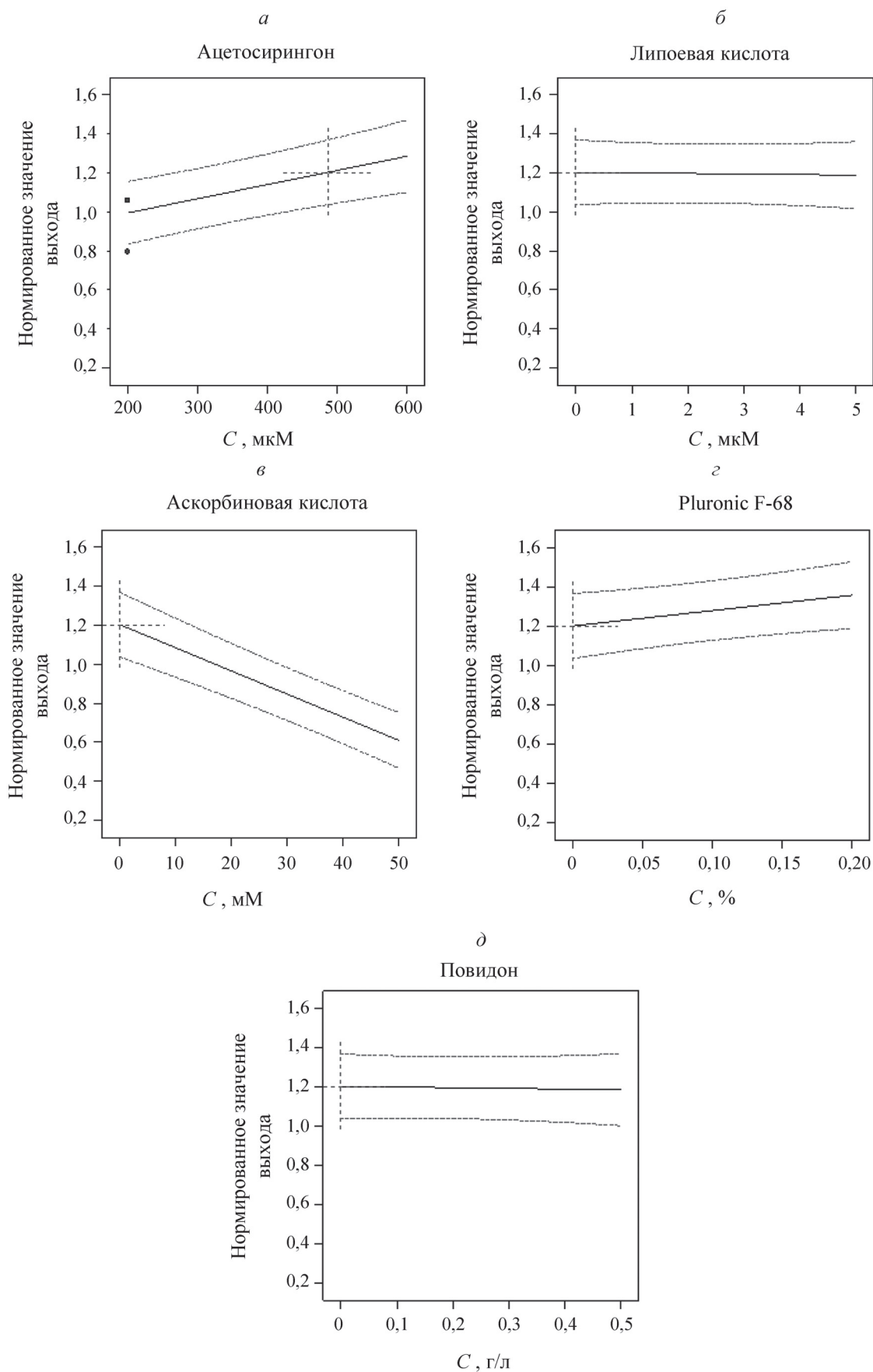
Аскорбиновая кислота (АК) как антиоксидант повышает выживаемость трансформированных эксплантов риса, сахарного тростника и арахиса в концентрации 20–300 мг/л (0,11–1,70 мМ) при совместном использовании с лимонной кислотой [8]. В работе [14] АК проявила дозозависимый эффект на экспрессию репортерного белка в *N. benthamiana* при диапазоне концентраций 0,28–1,68 мМ, максимум экспрессии наблюдался при 0,56 мМ (100 мг/л). В работе [6] использовали более высокие концентрации АК, было показано

дозозависимое снижение экспрессии репортерного белка при добавлении АК в среду для инфильтрации в количестве 10–100 мМ; при 5 мМ АК наблюдали незначимое повышение экспрессии репортерного белка.

Используемые при трансформации различных растений нейтральные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-20, Triton X-100, Silwet L-77, Pluronic F-68, применяют в концентрации не более 0,1% [6, 12–14], однако в нашей работе значимый положительный эффект Pluronic F-68 наблюдался при достаточно высокой концентрации (0,2%).

Повидон как антиоксидант, подавляющий некроз в тканях растений и повышающий их жизнеспособность, в концентрации 1% совместно с 2 мг/л дитиотреитола в среде для сокультивирования повышает выживаемость эксплантов лонгана и орхидеи [8]. В работе Norkunas [6] повидон в концентрации 0,1–1,0 г/л (0,01–0,1%) не оказывает положительного эффекта и даже снижает экспрессию репортерного белка при концентрациях 0,5 и 1,0 г/л.

Таким образом, с учетом полученных и литературных данных можно заключить, что дальнейшая оптимизация состава раствора для агроинфильтрации методом статистического планирования эксперимента в целях повышения экспрессии иммуноцитокина возможна при изменении диапазонов концентрации химических добавок. При использовании в составе раствора для агроинфильтрации 600 мкМ ацетосирингона и 0,2% Pluronic F-68 выход целевого белка составляет



Влияние отдельных факторов на нормированное значение выхода целевого белка (при нулевом значении остальных): *а* – ацетосирингона, *б* – липоевой кислоты, *в* – аскорбиновой кислоты, *г* – Pluronic F-68, *д* – повидона. По оси абсцисс – концентрации химических добавок; по оси ординат – значения нормированного выхода

более 500 мкг/г, что значительно превышает исходный уровень продукции (55–76 мкг/г), полученного с использованием прежней методики агроинфильтрации [16].

Работа выполнена в рамках программы исследований, запланированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (тема НИР: «Разработка технологий дизайна,

получения и применения персонализированных противоопухолевых терапевтических вакцин», рег. № АААА-А18-118032290146-5).

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Donini M., Marusic C. // *Biotech. Lett.* 2019. Vol. 41. N 3. P. 335 (<https://doi.org/10.1007/s10529-019-02651-z>).
2. Komarova T.V., Baschieri S., Donini M., Marusic C., Benvenuto E., Dorokhov Y.L. // *Expert Rev Vaccines*. 2010. Vol. 9. N 8. P. 859 (<https://doi.org/10.1586/erv.10.85>).
3. Загорская А.А., Дейнеко Е.В. 2017. Т. 64. № 6. С. 403.
4. Sheludko Y.V., Sindarovska Y.R., Gerasymenko I.M., Bannikova M.A., Kuchuk N.V. // *Biotechnol Bioeng.* 2007. Vol. 96. N 3. P. 608 (<https://doi.org/10.1002/bit.21075>).
5. Wroblewski T., Tomczak A., Michelmore R. // *Plant Biotechnol J.* 2005. Vol. 3. N 2. P. 259 (<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00123.x>).
6. Norkunas K., Harding R., Dale J., Dugdale B. // *Plant methods*. 2018. Vol. 14. N 1. P. 1 (<https://doi.org/10.1186/s13007-018-0343-2>).
7. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. // *Plant J.* 2003. Vol. 33. N 5 P. 949 (<https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2003.01676.x>).
8. Dan Y. // *In Vitro Cell Dev Biol-Plant.* 2008. Vol. 44. N 3. P. 149 (<https://doi.org/10.1007/s11627-008-9110-9>).
9. Zischewski J., Sack M., Fischer R. // *Biotechnol J.* 2016. Vol. 11. N 1. P. 107 (<https://doi.org/10.1002/biot.201500255>).
10. Lai E.M., Shih H.W., Wen S.R., Cheng M.W., Hwang H.H., Chiu S.H. // *Proteomics*. 2006. Vol. 6. N 14. P. 4130 (<https://doi.org/10.1002/pmic.200600254>).
11. Tsai Y.L., Wang M.H., Gao C., Klüsener S., Baron C., Narberhaus F., Lai E.M. // *Microbiology*. 2009. Vol. 155. N 10. P. 3270 (doi: 10.1099/mic.0.030676-0).
12. Curtis I.S., Nam H.G. // *Transgenic res.* 2001. Vol. 10. N 4. P. 363 (<https://doi.org/10.1023/A:1016600517293>).
13. Kim M.J., Baek K., Park C.M. // *Plant cell rep.* 2009. Vol. 28. N 8. P. 1159 (<https://doi.org/10.1007/s00299-009-0717-z>).
14. Zhao H., Tan Z., Wen X., & Wang Y. // *Plants*. 2017. Vol. 6. N 1. P. 9 (doi:10.3390/plants6010009).
15. Mandenius C. F., Brundin A. // *Biotechnol. Prog.* 2008. Vol. 24. N 6. P. 1191 (<https://doi.org/10.1002/btpr.67>).
16. Кособокова Е.Н., Шешукова, Е.В., Пинюгина М.В., Коноплина К.М., Косоруков В.С. // *Биотехнология*. 2019. Т. 35. № 2. С. 49 (doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-49-57).
17. Bashandy H., Jalkanen S., Teeri T.H. // *Plant Methods*. 2015. Vol. 11. N 1. Article number: 47 (<https://doi.org/10.1186/s13007-015-0091-5>).
18. Wydro M., Kozubek E., Lehmann P. // *Acta biochim. pol.* 2006. Vol. 53. N 2. P. 289 (https://doi.org/10.18388/abp.2006_3341).
19. Jeoung J.M., Krishnaveni S., Muthukrishnan S., Trick H.N., Liang G.H. // *Hereditas*. 2002. Vol. 137. N 1. P. 20 (<https://doi.org/10.1034/j.1601-5223.2002.1370104.x>).
20. Dan Y., Armstrong C.L., Dong J. et al. // *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 2009. Vol. 45. N 6. P. 630 (<https://doi.org/10.1007/s11627-009-9227-5>).

Поступила в редакцию 10.01.2020

Получена после доработки 12.01.2020

Принята к публикации 20.01.2020

OPTIMIZATION OF *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSIENT EXPRESSION OF IMMUNOCYTOKINE BASED ON HUMAN INTERFERON- α -2b AND ANTI-HER2 ANTIBODY IN *NICOTIANA BENTHAM*

K.M. Konoplina^{1*}, E.N. Kosobokova¹, E.V. Sheshukova², M.V. Pinyugina¹, A.A. Malchenkova¹, V.S. Kosorukov¹

(¹ FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation; ² FSSI «N. I. Vavilov Institute of General Genetics» of Russian Academy of Sciences; *e-mail: konoplinakm@gmail.com)

Optimization of the agroinfiltration media composition is one of the options to increase the efficiency of the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression of the target protein in plants. In the study, we have demonstrated effects of some chemical additives in the agroinfiltration media on the target immunocytokine yield by statistical design of the experiment. It was shown that acetosyringone (600 μ M) and pluronic F-68 (0.2%) increased the target protein yield significantly, while lipoic acid (0–5 μ M) and povidone (0–

0.5 g/L) did not have a significant impact on the protein yield and ascorbic acid (25–50 mM) decreased the product yield significantly. As a result of the study, the created composition of the agroinfiltration media made it possible to produce 500 µg/g of the target protein yield, which is a sufficient technological level for large-scale production of recombinant proteins in plants.

Key words: agroinfiltration, protein expression optimization, statistical design of the experiment, transient expression, *Nicotiana benthamiana*.

Сведения об авторах: Коноплина Ксения Михайловна – мл. науч. сотр. лаборатории трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России (konoplinakm@gmail.com); Кособокова Екатерина Николаевна – ст. науч. сотр. лаборатории трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (ekkos@mail.ru); Шешукова Екатерина Владимировна – мл. науч. сотр. лаборатории генетического контроля устойчивости к стрессам ФГУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, канд. биол. наук (konoplinakm@gmail.com); Пинюгина Марина Владимировна – мл. науч. сотр. лаборатории трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (marina160366@mail.com); Мальченкова Анастасия Алексеевна – лаборант-исследователь лаборатории трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (nastya.malchenkova@yandex.ru); Косоруков Вячеслав Станиславович – зав. лабораторией трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru).