



Усиление функций вирусных патогенов – как это делается за рубежом в рамках технологий синтетической биологии

М.В. Супотницкий✉, Н.В. Шачнева

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации,
111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19
✉ e-mail: 27nc_1@mil.ru

Основные моменты

- Современный уровень синтетической биологии позволяет создавать вирусы с дополнительными функциями (Gain-of-function, GOF), способные вызывать инфекционные процессы у людей, животных и растений.
- Инфекционный процесс, вызванный вирусом с GOF, может развиваться с нетипичными симптомами и поражениями внутренних органов, что затрудняет своевременную диагностику и снижает эффективность лечения.
- Конвенционных механизмов, блокирующих создание и распространение синтетических патогенов, не существует.
- Цифровизация синтетической биологии позволяет передавать патогены в любую точку мира в виде цифровых данных и воссоздавать их в условиях *in vitro*.

Актуальность. Технологии синтетической биологии, включая редактирование генома, доступны даже небольшим лабораториям и бесконтрольно используются для модификации вирусных патогенов, поражающих человека, животных и растения.

Цель исследования – показать, как за рубежом в рамках технологий синтетической биологии могут создаваться вирусы с GOF и их потенциальное поражающее действие.

Источниковая база исследования. Англоязычные публикации из базы PubMed.

Метод исследования. Аналитический. Применялись рекомендации PRISMA.

Результаты. Конструирование синтетических вирусов осуществляется преимущественно двумя методами: сборка по Гибсону (Gibson assembly); и рекомбинация, ассоциированная с трансформацией (Transformation-Associated Recombination, TAR), включая TAR-клонирование в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Вирусные геномы собираются из олигонуклеотидных фрагментов, в которые предварительно вносятся целевые модификации. Данный подход позволяет получать синтетические вирусы с GOF. В ходе исследования были идентифицированы молекулярные маркеры, позволяющие отличать синтетические вирусы от природных штаммов.

Заключение. Современные достижения синтетической биологии создают новую реальность – возможность ведения биологической войны, в которой будет невозможно распознать сам ее факт; тех, кто ее ведет; и какими поражающими средствами. Сложившаяся ситуация формирует принципиально новую парадигму биологических угроз в сферах медицины, ветеринарии и агрокультуры, что требует разработки международных механизмов управления возникающими рисками.

Ключевые слова: сборка по Гибсону; синтетические вирусы; синтетическая биология; TAR-клонирование; Gain-of-function

Для цитирования: Супотницкий М.В., Шачнева Н.В. Усиление функций вирусных патогенов – как это делается за рубежом в рамках технологий синтетической биологии. Вестник войск РХБ защиты. 2025;9(3):214–227. EDN:rjtfnx.

<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2025-9-3-214-227>

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: М.В. Супотницкий является заместителем главного редактора журнала с 2017 г. Это не повлияло на процесс рецензирования и окончательное решение. Н.В. Шачнева является редактором журнала с 2024 г. Это не повлияло на процесс рецензирования и окончательное решение.

© М.В. Супотницкий, Н.В. Шачнева, 2025

Journal of NBC Protection Corps. 2025. V. 9. No 3

Использование искусственного интеллекта: авторы не использовали.

Финансирование: федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации (27 НЦ МО РФ).

Поступила 09.05.2025 г. После доработки 11.08.2025 г. Принята к публикации 27.09.2025 г.

Enhancing viral pathogen functions – how it's done within synthetic biology technologies abroad

Mikhail V. Supotnitskiy✉, Natalia V. Shachneva

27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky
of the Ministry of Defence of the Russian Federation
Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation
✉ e-mail: 27nc_1@mil.ru

Highlights

- Modern synthetic biology technologies enable the creation of gain-of-function (GOF) viruses capable of causing infectious processes in humans, animals, and plants.
- GOF virus-induced infections may present with atypical symptoms and internal organ damage, complicating timely diagnosis and reducing treatment efficacy.
- There are no conventional mechanisms to prevent the creation and spread of synthetic pathogens.
- The digitization of synthetic biology allows pathogens to be transmitted as digital data and reassembled *in vitro*.

Relevance. Synthetic biology technologies, including genome editing and virus synthesis, are now accessible even to small laboratories and are actively used to modify pathogens affecting humans, animals, and plants.

Purpose of the study is to demonstrate how GOF viruses can be created abroad using synthetic biology technologies and assess their potential pathogenic effects.

Study base sources. English-language publications from the PubMed database.

Method. Analytical approach, following PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines.

Results. Currently, synthetic virus construction primarily employs two methods: Gibson assembly, Transformation-associated recombination (TAR), including TAR cloning in *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Viral genomes are assembled from oligonucleotide fragments with targeted modifications, enabling the production of synthetic viruses with designed properties, including GOF traits. The study also identified molecular markers distinguishing synthetic viruses from natural strains.

Conclusion. Advances in synthetic biology have created a new reality – the potential for biological warfare where the fact of an attack, its perpetrators, and the means used may remain undetectable. This situation establishes a fundamentally new paradigm of biological threats to medicine, veterinary science, and agriculture, necessitating the development of international risk management mechanisms.

Key words: Gain-of-function; Gibson Assembly; synthetic biology; synthetic viruses; TAR cloning

For citation: Supotnitskiy M.V., Shachneva N.V. Enhancing viral pathogen functions – how it's done within synthetic biology technologies abroad. *Journal of NBC Protection Corps.* 2025;9(3):214–227. EDN:rjtfnx.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2025-9-3-214-227>

Financial disclosure: The authors have no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: Mikhail V. Supotnitskiy is deputy Editor-in-Chief of the journal (since 2017). This had no impact on the peer review process and the final decision. Natalia V. Shachneva is editor of the journal (since 2024). This had no impact on the peer review process and the final decision.

AI use: The authors have not resorted to.

Существующие подозрения об искусственном происхождении пандемии COVID-19 требуют понимания возможностей ученых в конструировании новых патогенных организмов. Особые опасения вызывают патогены с усиленными функциями (Gain-of-function, GOF), создаваемые в рамках технологий синтетической биологии.

Цель исследования – показать, как за рубежом в рамках технологий синтетической биологии могут создаваться вирусы с GOF и их потенциальное поражающее действие.

Источниковая база исследования. Англоязычные публикации из базы PubMed.

Метод исследования. Аналитический. Применялись рекомендации PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses)¹.

Для достижения поставленной цели мы рассмотрели:

- терминологическую базу данных исследований;
- существующие подходы к конструированию геномов опасных вирусных патогенов на примерах восстановления вируса оспы лошадей и коронавирусов;
- применение технологии к вирусам сельскохозяйственных животных и растений;
- возможности идентификации вирусов, полученных методами синтетической биологии.

Но сначала определимся с терминами в их логической связи.

Логическая связь терминов. Термин *генная инженерия* относится к любому применению инструментов молекулярной биологии для изменения генетического кода организма, а *биотехнология* является отраслью его промышленного применения. Генная инженерия охватывает развивающиеся дисциплины *синтетической биологии*, использующей рациональный инженерный подход к созданию генетического материала (реструктуризация, перекодирование, минимизация геномов и др.). Среди них:

синтетическая геномика – предполагает создание вирусов, бактерий и эукариотических клеток на основе искусственных геномов, в ее рамках химически синтезируются целые хромосомы и геномы, и ими заменяют их естественные аналоги [1];

обратная генетика вирусов – частный случай синтетической биологии. Такое название произошло из-за того, что для получения способных к размножению РНК-вирусов ученые «идут» не от ДНК к РНК, как это обычно происходит в клетке при синтезе белка, а наоборот, от РНК вируса к комплементарной ей ДНК (кДНК), а с нее с помощью РНК-полимеразы фага Т7 «обратно» к инфекционной РНК. Синтезированная плюс-цепь РНК коронавирусного генома имитирует клеточную матричную РНК (мРНК) и эффективно распознается трансляционным аппаратом клетки-хозяина, что приводит к немедленному запуску продукции инфекционных вирусных частиц [1, 2];

синтетическая жизнь – биологическая система, созданная путем внедрения искусственно синтезированного генома в природную клетку-реципиент, где: полностью замененная хромосома осуществляет контроль над всеми клеточными процессами; фенотипические характеристики строго соответствуют заданным параметрам; сохраняется способность к неограниченной пролиферации с наследованием искусственного генома [3];

синтетическая клетка – минимальная жизнеспособная единица синтетической жизни, характеризующаяся: полной заменой природного генома синтетической ДНК; сохранением основных признаков жизни (метаболизм, репликация, адаптация); программируемыми функциональными свойствами; стабильным наследованием искусственного генетического материала в поколениях [3].

Все вышеупомянутые области исследований имеют пересекающиеся пространства и их разработки влияют друг на друга.

Усиление и утрата функции патогена – что это? Эксперименты, в результате которых появляются патогены с дополнительной функциональностью (увеличивают способность возбудителя вызывать заболевание путем повышения вирулентности, приобретения патогенности или трансмиссивности; устойчивые к антибактериальным и антивирусным лекарственным препаратам; способные преодолевать иммунитет, созданный доступными вакцинами, и др.), классифицируются как исследования по приобретению

¹ PRISMA. URL: <https://www.prisma-statement.org/> (дата обращения: 10.04.2025).

функции (Gain-of-function, GOF); а генетические изменения, приводящие к ослаблению патогенов (снижение способности патогена вызывать заболевание; повышение его чувствительности к лекарственным препаратам и т.п.), классифицируются как исследования по потере функции (loss-of-function, LOF)².

В исследованиях GOF и LOF используются одни и те же методы, оборудование и приемы.

Существующие подходы к конструированию геномов опасных патогенов. Синтезировать в условия *in vitro* полный геном простейшего клеточного организма или вируса в настоящее время невозможно – нет технологий химического синтеза ДНК, позволяющих сборку цепочек нуклеотидов необходимой длины [4]. Современные ДНК-синтезаторы способны создавать цепочки ДНК в пределах 200–250 пар нуклеотидов (п.н.) При увеличении их длины выход продукта и точность синтеза падают [3]. Первый полностью синтезированный геном клеточного организма, *Mycoplasma genitalium*, содержит 583 тысяч п.н. (т.п.н.) [5], средний геном коронавируса 28–32 т.п.н. [6], геном ортопоксвирусов 140–280 т.п.н. [7]. Поэтому их собирают из фрагментов.

Наиболее распространенный способ синтеза длинных цепочек ДНК в условиях *in vitro* разработан Дэниелем Дж. Гибсоном. Он позволяет одновременно объединять до 15 фрагментов ДНК на основе идентичности последовательностей. Для этого необходимо, чтобы ДНК фрагменты перекрывались с соседними фрагментами ДНК примерно на 20–40 п.о. Экзонуклеаза обнажает 3'-концы линейной ДНК; затем фрагменты, имеющие перекрывающуюся терминальную гомологию, отжигаются и служат праймерами для ДНК-полимеразы, которая заполняет пробелы; наконец, ДНК-лигаза запечатывает разрезы. Образуются замкнутые кольцевые молекулы ДНК. Первый геном искусственной клетки собрали с использованием этого метода. Основные достоинства метода: универсальность в генетической модификации – позволяет проводить направленный мутагенез с высокой точностью, включая: вставки и делеции заданных последовательностей; точечные мутации – снипсы (SNPs) в специфических сайтах; удаление нестабильных или мешающих элементов (например, шпилек или повторов); эффективность сборки – одновременное соединение нескольких фрагментов ДНК за одну реакцию без необходимости поэтапных

лигирований; совместимость с другими методами – может использоваться в комбинации с CRISPR/Cas9 или TAR-клонированием для сложных генетических конструкций [5, 8].

Как и все методы синтеза длинных цепочек ДНК, работающих в условиях *in vitro*, сборка Гибсона ограничена количеством сшиваемых фрагментов в одной реакции, что требует поэтапной процедуры сборки все более крупных конструкций геномной ДНК [8].

В настоящее время для конструирования длинных фрагментов ДНК- и РНК-геномов вирусов предпочтение отдается способу рекомбинации, связанному с трансформацией (transformation-associated recombination, TAR; TAR-клонирование; TAR-клонинг) в пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Их способность эффективно и с высокой точностью сшивать вместе линейные молекулы ДНК, представляющие собой гомологичные участки длиной всего 40 п.н. на концах, вывело из тупика конструирование крупных геномов, опиравшихся на методы *in vitro*. Дрожжи *S. cerevisiae* естественным образом поддерживают геном размером 12 Мб, состоящий из 16 хромосом в диапазоне 230–1500 т.п.о. в его гаплоидной версии, и могут существовать как полиплоид. Они чрезвычайно устойчивы к изменениям в содержании и архитектуре генома. В рамках TAR-клонирования конструирование геномов патогенов проводится с использованием следующих инструментов [9–10]:

- искусственной хромосомы дрожжей (Yeast Artificial Chromosome, YAC) – это сконструированная векторная система, предназначенная для репликации подобно хромосоме и стабильного сохранения больших фрагментов ДНК в клетках дрожжей;

- бактериальной искусственной хромосомы (Bacterial Artificial Chromosome, BAC) – конструкция ДНК, используемая для клонирования больших последовательностей ДНК в бактериях, чаще всего в *Escherichia coli*. Технологии BAC основаны на природных плазмидах, таких как конъюгативные F-плазмиды (обычно 94,5 т.п.н.), эффективно имитирующие естественные хромосомные механизмы, и способные стабильно сохранять большие вставки ДНК;

- сочетанием обоих подходов (YAC-BAC).

На практике последовательность вирусного генома делят на несколько фрагментов для последующей гомологичной рекомби-

² Schuerger C, Batalis St, Quinn K, et al. Understanding the Global Gain-of-Function Research Landscape. Center for Security and Emerging Technology. 2023. August. URL: <https://github.com/georgetown-cset/gain-of-function-survey/tree/main> (дата обращения: 12.05.2025).

нации в *S. cerevisiae*. В стратегии на основе YAC перекрывающиеся фрагменты ДНК³ доставляются в дрожжи *S. cerevisiae* вместе с линейаризованным YAC/TAR-вектором. Гомологичная рекомбинация в дрожжевых клетках собирает фрагменты ДНК, формируя YAC-вектор и получается плазмида YAC, содержащая полноразмерную кДНК вируса. Плазмида YAC трансфицируется в чувствительные клетки, где и происходит сборка вирусной частицы. В стратегии на основе BAC для соединения полноразмерного вирусного генома с вектором BAC используются сайты рестрикции и другие методы. Затем вектор трансформируется в *E. coli* для амплификации, а очищенная двухрепликонная плазмида BAC трансфицируется в чувствительные клетки (рисунк 1).

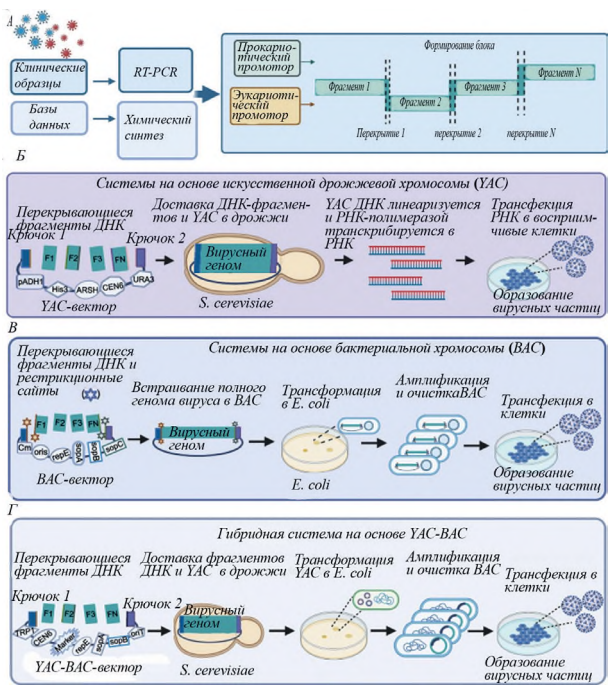


Рисунок 1 – Обзор стратегий и процессов, связанных с созданием инфекционных клонов вирусов с использованием YAC, BAC и комбинированных систем YAC-BAC. А – Амплификация генома вируса. Б – Системы на основе YAC. В – Системы на основе BAC. Г – Гибридные системы YAC-BAC (рисунок адаптирован авторами из работы Y. Wu со соавт. [2])

Figure 1: Overview of strategies and processes involved in the creation of infectious viral clones using YAC, BAC, and hybrid YAC-BAC systems (the figure is adapted by the authors from Y. Wu et al. [2])

³ Для генома РНК-вируса такие фрагменты получают обратной транскрипцией, т.е. сшиваются фрагменты кДНК.

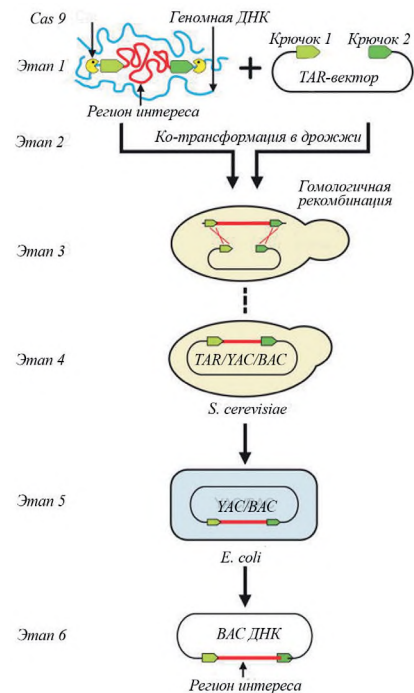


Рисунок 2 – Схема TAR-клонинга целевого гена или региона ДНК. Этап 1 – Подготовка вектора. Этап 2 – Котрансформация. Линейаризованный вектор + геномную ДНК вводят в дрожжи *S. cerevisiae*. Этапы 3 и 4 – Рекомбинация между таргетными последовательностями в векторе и соответствующими участками в фрагменте геномной ДНК. «Крючки» вектора находят гомологичные участки в геномной ДНК, происходит «сшивание» в кольцевую молекулу с нужным геном. Этап 5 – Перенос выделенных TAR-молекул, содержащих интересующий регион, из дрожжевых клеток в бактериальные с помощью электропорации. Этап 6 – Секвенирование или функциональный анализ (рисунок адаптирован авторами из работы N. Kouprina, V. Larionov [9])

Figure 2: Schematic of TAR cloning for target gene/DNA region isolation. Step 1, Vector preparation. Step 2, Co-transformation. Linearized vector + genomic DNA are introduced into *S. cerevisiae* yeast. Steps 3–4, Homologous recombination between vector targeting sequences and genomic DNA fragments. Vector “hooks” identify homologous regions, enabling circularization with the desired gene. Step 5, Transfer of isolated TAR molecules (containing target region) from yeast to bacterial cells via electroporation. Step 6, Sequencing or functional analysis (the figure is adapted by the authors from N. Kouprina, V. Larionov [9])

Специализированные «крючки» (hook 1 и hook 2) на концах вектора TAR представляют собой перекрывающиеся последовательности, которые обеспечивают точную вставку

целевого фрагмента. Совместная трансформация вектора и целевого фрагмента в дрожжах запускает гомологичную рекомбинацию, обусловленную врожденными способностями дрожжей к репарации ДНК, что приводит к бесшовной сшивке фрагментов, т.е. без лишних нуклеотидов в местах их интеграции. YAC позволяют сохранять и изучать более крупные фрагменты геномной ДНК в их естественном контексте (до 2000 т.п.о.); ВАС – менее емкая система (300 т.п.о.), но проще в обращении и модификации с помощью стандартных методов молекулярной биологии [2]. Последовательность TAR-клонинга генов показана на рисунке 2.

Работу этих стратегий и процессов рассмотрим ниже на конкретных примерах получения синтетических ДНК- и РНК-вирусов.

Конструирование синтетических ортопоксвирусов – вирус лошадиной оспы. Вирус лошадиной оспы (*Horsepox virus*, HPXV) изолирован от лошади в Монголии в 1976 г. – изолят MNR-76. Его геном составляет 212 т.п.о. Он содержит инвертированные терминальные повторы длиной 7,5 т.п.о. и не имеет обширных tandemных терминальных повторов. Филогенетический анализ консервативного региона показал тесную связь HSPV с секвенированными изолятами вируса осповакцины (VACV) и вируса оспы кроликов [12].

Работа по восстановлению HPXV проводилась с целью показать возможность создания вымершего ортопоксвируса по его неполной ДНК последовательности [13]⁴.

Технически эта задача имела сложное решение по следующим причинам: геном HPXV огромен даже для ортопоксвирусов, синтезировать его в условия *in vitro* в виде одной последовательности невозможно; нуклеотидная последовательность генома вируса не была определена полностью, шпилечные теломеры концевых его участков, определяющие инициацию репликации, регуляцию транскрипции генов и упаковку в вирионы, расшифрованы не были; поксвирусы не могут быть просто извлечены из трансфицированных клеток, поскольку их ДНК не является инфекционной.

Х.Д. Yao и D.H. Evans [14] ранее показали, что клетки, инфицированные вирусом фибромы Шопа (*Shope fibroma virus*, SFV –

вирус семейства *Poxviridae*), обеспечивают клеточную среду, способную собирать из рестрикционных фрагментов ДНК геном VACV. Этим воспользовались R.S. Noyse с соавт. [13] для восстановления вируса HPXV, способного к репликации в клетках и заражению животных. Их эксперимент выполнен следующим образом.

Дизайн генома синтетического химерного HPXV (synthetic chimeric HPXV, scHPXV) основан на опубликованной последовательности штамма HPXV MNR-76 (GenBank, регистрационный номер DQ792504). Его разделили на десять фрагментов с перекрывающимися последовательностями с каждым соседним фрагментом (не менее 1,0 т.п.н.), обеспечивающих достаточную гомологию для поддержки рекомбинации между совместно трансфицированными фрагментами. Концевые 40 п.н. из последовательности HPXV не были включены в синтетические фрагменты ITR. Шпилечные теломеры заменили двумя синтетическими шпилечными структурами на основе последовательностей штамма VACV WR. Все фрагменты ДНК HPXV были синтезированы компанией GeneArt и поставлены в виде плазмидных клонов в *E. coli*⁵. ДНК концевых шпилек VACV были приобретены у Integrated DNA Technologies в виде 157-нуклеотидных фрагментов ДНК. Их добавили к левому и правому фрагментам ITR в случайной ориентации с использованием сшивки ДНК-лигазой таким образом, чтобы сохранить всю исходную опубликованную последовательность HPXV. В качестве маркера, позволяющего отобрать клоны scHPXV, в локус HPXV095 (тимидинкиназа) внутри третьего фрагмента была вставлена кассета, кодирующая желтый флуоресцентный белок, слитый с белком гуанинфосфорибозилтрансферазой (YFP-gpt), находящимся под контролем раннего-позднего промотора поксвируса. Схема сконструированного генома scHPXV YFP-gpt::095 приведена на рисунке 3.

Сборку генома вируса проводили трансфекцией клеток BGМК (клетки почек зеленой мартышки), предварительно инфицированных SFV. Размножившиеся вирусы⁶ собирали путем замораживания-оттаивания, разбавляли и повторно высевали на перевиваемые клетки почки африканской зеленой мартышки (BSC-40). scHPXV YFP-gpt::095 от-

⁴ Department of Medical Microbiology & Immunology and Li Ka Shing Institute of Virology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, Tonix Pharmaceuticals, Inc., New York, New York, United States of America.

⁵ Каким методом синтезированы такие последовательности ДНК, не указано.

⁶ По меткому замечанию К. Вентера, «вирус вне клетки не живет кристалла соли» [3]. Способность к воспроизводству он получает только, если его геном сможет мобилизовать ресурсы клетки, что и сделано в данном эксперименте благодаря вирусу-помощнику – SFV.

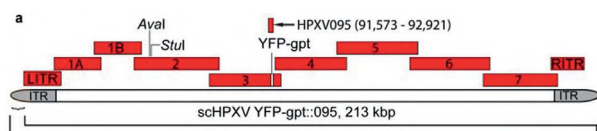


Рисунок 3 – Промежуточный геном scHPXV, использованный для получения химерного варианта вируса оспы лошадей (рисунок адаптирован авторами из работы R.S. Noyce с соавт. [13])

Figure 3: Intermediate scHPXV genome used to generate a chimeric horsepox virus variant (the figure is adapted by the authors from R.S. Noyce et al. [13])

бирали, используя желтую флуоресценцию в качестве критерия отбора. Затем селекционный маркер YFP-gpt удаляли с помощью гомологичной рекомбинации. Для этого фирме ThermoFisher Scientific был заказан фрагмент ДНК длиной 1349 п.н., кодирующий нуклеотиды HPXV 91573–92921, и включающий ген HPXV095 плюс ~ 400 п.н. гомологии, фланкирующие обе стороны локуса тимидинкиназы. Эта ДНК была клонирована в коммерческий вектор, предоставленный GeneArt. Для замены кассеты YFP-gpt клетки и «возвращения на место» локуса тимидинкиназы, клетки BSC-40 инфицировали scHPXV YFP-gpt::095, а затем трансфицировали в них линейаризованную плазмиду и типовыми вирусологическими методами выделяли нефлуоресцентные вирусы. Геном scHPXV был депонирован в GenBank под номером доступа KY349117. Сравнить его биологические свойства с таким же вирусом, циркулирующим в природе, невозможно, так как его природный резервуар неизвестен, у лошадей в настоящее время его не находят.

Получение синтетических производных SARS-CoV-2. X. Xie с соавт. [15] собрали производные SARS-CoV-2 из 7 синтетических фрагментов ДНК. Сначала их клонировали в плазмиды, затем в условиях *in vitro* с помощью ДНК-лигазы фага T4 сшивали в полноразмерную ДНК SARS-CoV-2. Полноразмерную плюс-РНК вируса получали на матрице ДНК РНК-полимеразой. С помощью электропорации ее вводили в перmissive клетки (Vero E6 или BHK-21), где она запускала сборку вирусных частиц за счет ресурсов клетки. Полногеномным секвенированием по Сэнгеру подтверждали соответствие РНК синтетического SARS-CoV-2 консенсусной последовательности SARS-CoV-2.

Платформа, использующая для создания синтетических РНК-вирусов TAR-технология, более функциональна. T.N. Thao с соавт. [16] из восьми перекрывающихся фрагментов ДНК воссоздали вирус гепатита мышей

MHV A59 и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV). Так же они клонировали другие коронавирусы: HCoV-229E2, HCoV-NKU1, MERS-CoV-Riyadh-1734-2015; и вирусы других семейств, такие как вирус Zika из семейства *Flaviviridae* (GenBank: KX377337) и респираторно-синцитиальный вирус человека из семейства *Pneumoviridae* (hRSV). Клонирование этих вирусных геномов с помощью технологии TAR во всех случаях было успешным, независимо от источника вируса, матрицы нуклеиновой кислоты или количества фрагментов ДНК. Клонирование hRSV-B осуществлено без какой-либо предварительной информации о геноме вируса, непосредственно из клинического образца (носоглоточный аспират) из четырех перекрывающихся фрагментов ДНК (GenBank: MT107528).

Синтетические копии вирусов могут по биологическим свойствам не отличаться от циркулирующих в природе. По данным Ch. Ye с соавт. [17] синтетический SARS-CoV-2 при интраназальном инфицировании золотых сирийских хомячков проявлял ту же способность к репликации, вирулентность и патогенность, что и естественный изолят SARS-CoV-2.

Изучение биологии химерных коронавирусов. V.D. Menachery с соавт. [18] методом обратной генетики был создан ранее не существовавший вирус – SHC014-MA15, способный к репликации в дыхательных путях человека и животных. Для этого в нуклеотидную последовательность субъединицы S1, циркулирующего среди летучих мышей коронавируса SHC014 – ближайшего «родственника» SARS-CoV, и не проявившего себя в качестве патогена для людей из-за различия по 14 аминокислотным остаткам в участке шипа, связывающегося с ACE2 человека, были внесены точечные изменения. Исследователи заменили нуклеотидную последовательность гена, кодирующего субъединицу S1 у SHC014, на аналогичную от SARS-CoV. Остальные гены, т.е. те, которые определяют формирование транскрипционного комплекса вирусной репликации и сборку его частиц в клетке, изменениям не подвергались.

Моноклональные антитела (мАТ) широкого защитного спектра (109.8, SHC014-MA15, 230.15 и 227.14), показавших хороший нейтрализующий эффект против SARS-CoV, оказались неэффективными в отношении SHC014-MA15.

Эксперименты с синтетическими коронавирусами, поражающими сельскохозяйственных животных. В последние годы в конструирование химер стали вовлекаться

коронавирусы сельскохозяйственных животных. С применением CRISPR/Cas9-технологии получен дельта-коронавирус свиней (Porcine deltacoronavirus, PDCoV), обнаруженный в Гонконге в 2012 г. Это новый и плохо изученный коронавирус, вызывающий острую диарею и высокую летальность среди заболевших поросят. У ветеринаров он вызывает опасения из-за широкого круга межвидовых носителей, включая людей. Куры, индюшата и телята могут быть экспериментально заражены PDCoV. Сконструированный с помощью TAR инфекционный клон PDCoV, обладает биологическими характеристиками, схожими с характеристиками штамма дикого типа [19]. То есть это очередной «фальшивый вирус», способный появиться на животноводческих фермах независимо от своих природных резервуаров.

Результаты отдельных экспериментов позволили показать возможность повышения вирулентности синтетических коронавирусов и обнаружить изменения в патогенезе вызванной ими болезни. Например, введением фуринового сайта в S-белок вируса бронхита кур (infectious bronchitis virus, IBV), вызывающего у молодняка поражение органов дыхания, репродуктивных органов и нефрозонефритный синдром, была переключена его тропность с клеток дыхательных путей и мочеполовой системы на клетки ЦНС. Наблюдались поражения ЦНС: значительная гиперплазия микроглии, образование микроглиальных узелков и периваскулярные воспалительные инфильтраты в ткани мозга [20].

Эксперименты с синтетическими вирусами, поражающими сельскохозяйственные растения. Большая часть населения мира удовлетворяет свои потребности в калориях за счет растительной пищи, такой как пшеница, рис и кукуруза. Весь опыт человеческой цивилизации свидетельствует о том, что массовый голод по жертвами сопоставим с применением ядерного оружия [21]. В практическом аспекте, уничтожение сельскохозяйственных посевов – наиболее древнее средство тотальной войны, позволяющее не убивая людей и животных, не разрушая городов и предприятий, победить сильного врага [22]⁷.

Синтетические вирусы растений – новый инструмент биологической войны. Большинство вирусов растений имеют небольшие геномы из одноцепочечной РНК (+) – т.е. «готовой» мРНК, которую рибосомы растения

могут сразу транслировать в белок без стадии ДНК-транскрипции в ядре. Ими можно манипулировать через кДНК вируса, транскрибировать *in vitro* или *in planta* (введение кДНК в растение через агробактерию, где она транскрибируется в вирусную РНК с помощью белок-синтезирующей системы растения).

Для получения синтетических вирусов растений используются методы обратной генетики (РНК-вирусы) и сборки крупноблочных синтетических ДНК-последовательностей (ДНК-вирусы). Основная цель сборки инфекционных клонов – создание плазмидных векторов, содержащих точную копию вирусного генома, способную в подходящих условиях запустить инфекцию, имитирующую естественную.

Поражения синтетическими вирусами растений на больших площадях возможно распространением с беспилотников:

- аэрозолей и капель генетически модифицированных бактерий *Agrobacterium tumefaciens*, содержащих плазмидные векторы с копиями вирусных геномов;
- углеродных нанотрубок (УНТ) и магнитных наночастиц, загруженных ДНК, кодирующей геномы вирусов [27];
- синтетических вирусов с клонированными генами белков, вызывающих патологические процессы у растений и способных передаваться между ними [28].

Новой двойной технологией можно считать редактирование генома растений с помощью вирусных векторов, кодирующих гидовую РНК (guide RNAs, gRNAs: гРНК), в том числе CRISPR-Cas9 [29].

Применение *Agrobacterium*. Важным открытием в вирусологии растений стало доказательство способности почвенной бактерии *A. tumefaciens* – возбудителя коронной галловой болезни (образование опухолей) у более чем 140 видов растений, способности инициировать вирусные инфекции после обработки их листьев штаммами, содержащими инфекционные клоны растительных вирусов [30]. Способ заражения растений посредством *Agrobacterium* разработан почти 30 лет назад. Он заключался в нанесении на ткани растения раствора, содержащего *A. tumefaciens*, 5 % сахарозы и 500 мкл/л органосиликонового поверхностно-активного вещества (ПАВ) Silwet L-77. Сахароза и ПАВ играют в этой рецептуре решающую роль в успешной трансформации растений [31]. *Agrobacterium* способны инфицировать дву-

⁷ Описания наиболее опасных патогенов растений приведены в работах [23–25]; достижения Холодной войны в практике войны против сельскохозяйственных растений, приведены в нашей работе [26].

дольные и однодольные растения, а также травянистые и древесные культуры, включая цитрусовые, виноград и яблоню [32].

Одна или несколько копий вирусных геномов встраиваются между левой и правой границами Т-ДНК плазмиды, пригодной для репликации в *Agrobacterium*. При контакте бактерий с растительными тканями Т-ДНК кассеты переносятся в клетки хозяина, и транскрипция с последующей трансляцией Т-ДНК приводит к синтезу вирусных компонентов, необходимых для инициации инфекционного процесса. Т-ДНК кассеты не требуют стабильной интеграции в геном хозяина. Для заражения растения достаточно и временной экспрессии трансгена [32].

Обобщающая схема сборки инфекционных клонов вирусов растений показана на рисунок 4.

Ниже приведены несколько примеров, показывающие возможности синтетической биологии для получения вирусов растений с усиленными функциями.

Применение вируса табачной мозаики для инициирования ложной патологии растений. Объектом таких исследований стал вирус табачной мозаики (Tobacco mosaic virus, TMV) – одноцепочечный РНК-вирус с положительным геномом, поражающий в основном растения из семейства пасленовых и, что особенно важно, табака. Он проникает в растение через микротравмы на поверхности листьев или стеблей, и передается от растения к растению. В окружающей среде устойчив к физическим факторам.

Геном TMV расшифрован в 1982 г., но не полностью. Инфекционной эталонной последовательности молекулы ДНК до 2014 г. не существовало. В. Соопер [28] из Лаборатории геномики и улучшения сортов сои Минсельхоза США, синтезировал такую последовательность ДНК из перекрывающихся олигонуклеотидов учитывая консенсус с другими последовательностями TMV. ДНК была транскрибирована в РНК (1-34СЕ-30) и упакована в вирионы с помощью очищенного капсида TMV. Полученный синтетический вирус (FL-TMV-NA) вызывал характерные симптомы болезни у табака. Затем были созданы химеры ДНК TMV с ДНК капсидного белка вируса мозаики томата (Tomato mosaic virus, ToMV) и вируса полосатой мозаики ячменя (Barley stripe mosaic virus, BSMV). Вирус, экспрессирующий капсидный белок ToMV, у *Nicotiana sylvestris* (1-34СЕ-ToMV CP-30), вызывал симптомы болезни, похожие на симптомы ToMV, т.е. в данном эксперименте был получен вирус с GOF, вводящий в заблуждение относительно этиологии болезни

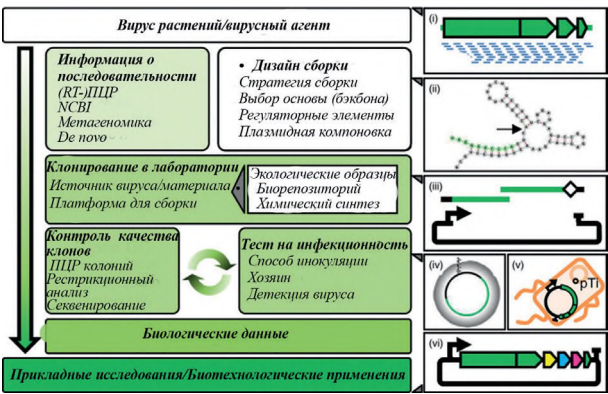


Рисунок 4 – Схема сборки инфекционных клонов рас вирусов растений. Справа, сверху вниз, представлены ключевые этапы сборки: i – идентификация вируса с помощью короткочитаемого секвенирования; ii – разработка регуляторного элемента (например, рибозима) для повышения эффективности инокуляции; iii – одностадийная сборка генома вируса и регуляторных элементов в бинарный вектор на основе перекрывающей-ПЦР; iv – проверка полноразмерных клонов секвенированием (в данной работе короткочитаемое секвенирование Illumina); v – тесты на инфекционность с помощью *Agrobacterium*-опосредованной инокуляции (pTi, дефектная Ti-плазмида); vi – конструирование вирусных векторов для экспрессии гетерологичных белков в растениях (рисунок адаптирован авторами из работы F. Pasin et al. [27])

Figure 4: Schematic of infectious clone assembly for plant viruses. The key assembly steps are shown on the right (top to bottom): i, virus identification via short-read sequencing; ii, regulatory element design (e.g., ribozyme) to enhance inoculation efficiency; iii, one-step assembly of viral genome and regulatory elements into a binary vector using overlap extension PCR; iv, full-length clone verification by sequencing (Illumina short-read sequencing in this study); v, infectivity testing via *Agrobacterium*-mediated inoculation (using a disarmed Ti plasmid, pTi); vi, engineering of viral vectors for heterologous protein expression in plants (the figure is adapted by the authors from F. Pasin et al. [27])

[28]. Таким образом, приобретение TMV усиленных функций проявилось расширением круга хозяев и способностью вызывать инфекцию у растений табака с нехарактерными для нее симптомами болезни.

Превращение латентного вируса растений в инфекционный. Вирус латентной инфекции алжирского винограда (Grapevine Algerian latent virus, GALV) – представитель рода *Tombusvirus*, впервые выделен в 1989 г. из винограда (*Vitis* spp.) алжирского происхождения. Впоследствии его обнаруживали в пробах воды на западе Сицилии, из канав и ручьев в сельскохозяйственных районах Германии, а также у культивируемых декоративных растений. За 20 лет, предшествующих

исследованию итальянских ученых А. Lovato с соавт.⁸ [33], сообщений о естественном заражении винограда GALV не поступало, сведения об искусственной инокуляции виноградных растений отсутствовали. Эпидемическое исследование кДНК, полученных от 152 растений винограда с симптомами, похожими на вирусные, не выявило присутствия GALV ни в одном из образцов.

Исследователи провели филогенетический анализ всех известных последовательностей GALV и эпидемическое исследование образцов виноградной лозы для выявления вируса. Клон GALV-Nf под контролем промотора фага T7 был химически синтезирован на основе полноразмерной последовательности изолята вируса, выделенного из декоративного ядовитого растения из Южной Америки – *Solanum mammosum* (nipplefruit, Содомское яблоко), единственно доступного на момент разработки проекта. Его вставили в бинарный вектор pK7WG2-MCS.HRz.GALV-Nf [33].

Инфекционные транскрипты GALV-Nf протестировали на *N. benthamiana*. Через 4 сут на инокулированных листьях появились сливающиеся хлоротические пятна, а через 7 сут после инокуляции, начиная с проксимальной части листа, развился системный хлороз жилок. Ультраструктурные изменения, вызванные GALV-Nf у *N. benthamiana*, были аналогичны тем, которые вызывают вирусы рода *Tombusvirus* у других растений. Специфический инфекционный процесс подтвержден серологическим и молекулярным анализами. Растения винограда, взятые в эксперимент, представляли различные генотипы, выращенные из соматических эмбрионов, чтобы избежать возможного влияния необнаруженных вирусов или вириодов. Через 5 нед. после инфильтрации на молодых листьях обнаружены симптомы болезни. Наблюдалось неравномерное хлоротическое окрашивание основных жилок листьев у растений *V. riparia*, небольшое закручивание краев листьев вверх у растений сорта Султания (Sultanina) и легкое крапчатое окрашивание листьев у растений сорта Корвина (Corvina Veronese). Эффективность заражения составляла ~90 %. Наиболее уязвимым к синтетическому GALV-Nf оказался сорт Неббиоло.

Ультраструктурный анализ листьев виноградной лозы, пораженных GALV-Nf, показал наиболее сильное поражение клеток, прилегающих к мелким жилкам, особенно в губчатом мезофилле [33].

Одной из причин приобретения GALV усиленных функций, проявившихся в инфек-

ционности для отдельных сортов винограда, стало использование полноразмерной последовательности изолята вируса ядовитого растения *S. mammosum*, которая не содержала «ошибок», т.е. отдельных точечных мутаций в геноме этого же вируса из виноградной лозы алжирского происхождения.

Идентификация вирусов, полученных методами синтетической биологии. Теоретически, если синтез нуклеотидной последовательности был проведен с идеальной точностью, и она собрана методом бесшовной сборки (например, Gibson Assembly), то «фальшивый вирус» на уровне генома неотличим от природного. Однако есть нюансы:

- в геноме могут быть обнаружены замены нуклеотидной последовательности синтезируемого вируса на взятые от других вирусов. Например, как это сделали R.S. Нойсе с соавт. [13], собиравшие геном scHPXV – они заменили его шпилечные теломеры (сведения о которых в базах отсутствовали) двумя известными синтетическими шпилечными структурами, взятыми из генома VACV WR. Для синтеза Bat-SCoV, SARS-подобного вируса летучих мышей, М.М. Becker с соавт. [34] использовали функциональные 5'-UTR и регуляторные последовательности транскрипции от SARS-CoV, поскольку нуклеотидная последовательность 5'-UTR Bat-SCoV оказалась неполной;

- внесены изменения в критически важные для проявления вирулентности и специфичности участки генома вируса, например, введение последовательности для расщепления фурином между последовательностями, кодирующими S1- и S2-субъединицы спайкового белка вируса бронхита кур [19]; или замена нуклеотидной последовательности гена, кодирующего субъединицу S1 у коронавируса летучих мышей SHC014, на аналогичную от SARS-CoV [17];

- признаки консенсусного проектирования – последовательность ДНК синтезирована из перекрывающихся олигонуклеотидов, и подогнана под консенсус с другими последовательностями (т.е. такого индивидуального генома в природе не существует), как это сделал В. Cooper [28] с геном TMV, и М.М. Becker с соавт. [34] при сборке генома вируса летучих мышей – Bat-SCoV;

- наличие «шрамов сборки» – если использовался небесшовный метод клонирования, например, по рестрикционным сайтам, в этом случае об искусственном происхождении вируса говорят последовательности

⁸ Университеты в Милане, Вероне, Тоскане и ряд других организаций.

сайтов рестрикции (*EcoRI* оставляет шрам GAATTC, *BamHI* – GGATCC) или линкеров;

- обнаружение генома вымершего вида [13, 35];

- обнаружение сайта *LoxP*, оставшегося после TAR-сборки, если использовалась технология точного редактирования генома с помощью системы Cre-рекомбиназа-*loxP* (сайт связывания белка Cre). Между сайтами *LoxP* можно удалять, инвертировать или вставлять гены, но сайт остается [36];

- наличие адаптивных мутаций, появившихся при пассировании синтезированных крупных ДНК-содержащих вирусов в культурах клеток [37];

- невозможность в ходе синтеза ДНК правильно воспроизвести метки эпигенетической регуляции (паттерны метилирования, ошибки в укладке РНК – некорректные петли в шпильках и др.), регулирующие активность генов, не изменяя саму последовательность ДНК [38];

- «чужие» промоторные последовательности векторов в геноме жертвы. Например, в Т-клетках умерших от Т-клеточной лейкемии детей, обнаружен интегрировавшийся с их геномом ретровирусный вектор с клонированным трансгеном *LMO2* (кодирует транскрипционный активатор факторов, необходимый для дифференциации эритроцитов в костном мозге) и регуляторными элементами. При расследовании данного случая обнаружено, что этот ген находится под контролем LTR вируса мышиной лейкемии Молони, в геноме человека никогда не встречавшегося [39];

- филогенетические аномалии: рекомбинации между далекими штаммами, которые маловероятны в природе, варианты вируса без установленных предков [40];

- статистика кодонов – искусственные геномы могут демонстрировать неестественную оптимизацию кодонов, что можно выявить с помощью индекса адаптации кодонов (Codon Adaptation Index, CAI)⁹;

- «цифровые опечатки», оставленные коммерческими синтезаторами ДНК в виде специфических паттернов мутаций. Они могут проявляться в виде: подмены оснований; случайной «потери» олигонуклеотидных блоков – их не включают в итоговую расшифровку ДНК; ошибок при сборке фрагментов –

например, некоторые фрагменты ошибочно помечаются как повторы, неправильно происходит соединение фрагментов; SNP-паттерны (снимки), как ошибки *Taq*-полимеразы при синтезе фрагментов и др.¹⁰;

- «водяные знаки» в межгенных последовательностях, оставляемые честолюбивыми синтетическими биологами (примерно так, как художник ставит свою подпись на картине). Используются разные кодоны для представления каждой из двадцати букв аминокислотного «алфавита». Каждые три нуклеотида в этой записи соответствуют определенной аминокислоте, входящей в состав природных белков. Таких аминокислот всего 20, каждая из них, помимо традиционного химического названия, обозначается одной из букв латинского алфавита [3].

Заключение

Приведенные данные показывают состоявшийся переход синтетической биологии в цифровую, позволяющую распространять опасные патогены в любую часть мира в цифровом формате с последующей «материализацией» в лабораторных условиях. Технологический уровень синтетической биологии пока не позволяет ей выйти за пределы геномов вирусов и одноклеточных организмов. Однако он позволяет создавать вирусы с GOF, способные вызывать инфекционный процесс у людей, животных и растений. Добавленные функции включают расширение круга инфицируемых видов животных и растений; появление патогенности для людей у вирусов, ранее для них непатогенных; и способность вызывать инфекцию с нехарактерными для ее типичного течения симптомами болезни и поражениями внутренних органов. Технологии, позволяющие получение вирусов с GOF, доступны широкому кругу исследователей уже не менее 30 лет. Наиболее универсальной в настоящее время является платформа синтетической геномики TAR. Конвенционных механизмов, блокирующих распространение синтетических патогенов не существует. Фактически мы имеем дело с новой реальностью биологических угроз в медицине, животноводстве и растениеводстве, требующей разработки международных методов контроля.

⁹ Codon Adaptation Index. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Codon_Adaptation_Index (дата обращения: 10.08.2025).

¹⁰ Биоинформатическая обработка данных секвенирования. URL: <https://sesana.ru/bioinformaticeskaya-obrabotka-dannykh-sekvenirovaniya> (дата обращения: 10.08.2025).

Ограничения исследования / Limitations of the study

Обусловлены анализом только англоязычных статей из полнотекстовых англоязычных научных журналов, доступных через сеть Интернет / The limitations of the study are stipulated by the analysis of the articles retrieved from full-text academic periodicals, written in English and available on the Internet.

Список источников / References

1. Schindler D. Genetic Engineering and Synthetic Genomics in Yeast to Understand Life and Boost Biotechnology. *Bioengineering (Basel)*. 2020;7(4):137.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering7040137>
2. Wu Y, Gao S, Liu G, Wang M, Tan R, Huang B, Tan W. Development of viral infectious clones and their applications based on yeast and bacterial artificial chromosome platforms. *Mol Biomed*. 2025;6(1):26.
<https://doi.org/10.1186/s43556-025-00266-7>
3. Вентер К. Жизнь на скорости света. От двойной спирали к рождению цифровой биологии. М.; 2018.
Venter JC. *Life at the Speed of Light: From the Double Helix to the Dawn of Digital Life*. New York: Viking; 2013.
4. Venter JC, Glass JI, Hutchison CA 3rd, Vashee S. Synthetic chromosomes, genomes, viruses, and cells. *Cell*. 2022;185(15):2708-24.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.046>
5. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Baden-Tillson H, Zaveri J, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*. 2008;319(5867):1215-20.
<https://doi.org/10.1126/science.1151721>
6. Kuo L, Godeke GJ, Raamsman MJ, Masters PS, Rottier PJ. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol*. 2000;74(3):1393-406.
<https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1393-1406.2000>
7. Онищенко ГГ, Сизикова ТЕ, Лебедев ВН, Борисевич СВ. Новые представители рода *Orthopoxvirus*. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2023;12(2):8-13.
<https://doi.org/10.33029/2305-3496-2023-12-2-8-13>
- Onishchenko GG, Sizikova TE, Lebedev VN, Borisevich SV. New representatives of the genus *Orthopoxvirus*. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training [Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie]*. 2023;12(2):8-13. (in Russian).
<https://doi.org/10.33029/2305-3496-2023-12-2-8-13>
8. Koster CC, Postma ED, Knibbe E, Cleij C, Daran-Lapujade P. Synthetic Genomics From a Yeast Perspective. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:869486.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.86948>
9. Kouprina N, Larionov V. Selective isolation of genomic loci from complex genomes by transformation-associated recombination cloning in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Protoc*. 2008;3(3):371-7.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.5>
10. Kouprina N, Larionov V. Transformation-associated recombination (TAR) cloning and its applications for gene function; genome architecture and evolution; biotechnology and biomedicine. *Oncotarget*. 2023;14:1009-33.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.28546>
11. Yang L, Tian L, Li L, Liu Q, Guo X, Zhou Y, et al. Efficient assembly of a large fragment of monkeypox virus genome as a qPCR template using dual-selection based transformation-associated recombination. *Virol Sin*. 2022;37(3):341-7.
<https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.02.009>
12. Tulman ER, Delhon G, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sandybaev NT, et al. Genome of horsepox virus. *J Virol*. 2006;80(18):9244-58.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00945-06>
13. Noyce RS, Lederman S, Evans DH. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One*. 2018;13(1):e0188453.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188453>
14. Yao XD, Evans DH. High-frequency genetic recombination and reactivation of orthopoxviruses from DNA fragments transfected into leporipoxvirus-infected cells. *J Virol*. 2003;77(13):7281-90.
<https://doi.org/10.1128/jvi.77.13.7281-7290.2003>
15. Xie X, Lokugamage KG, Zhang X, Vu MN, Muruato AE, Menachery VD, Shi PY. Engineering SARS-CoV-2 using a reverse genetic system. *Nat Protoc*. 2021;16(3):1761-84.
<https://doi.org/10.1038/s41596-021-00491-8>
16. Thi Nhu Thao T, Labrousseau F, Ebert N, V'kovski P, Stalder H, Portmann J, et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature*. 2020;582(7813):561-5.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2294-9>

17. Ye C, Chiem K, Park JG, Oladunni F, Platt RN 2nd, Anderson T, et al. Rescue of SARS-CoV-2 from a Single Bacterial Artificial Chromosome. *mBio*. 2020;11(5):e02168-20.
<https://doi.org/10.1128/mBio.02168-20>
18. Menachery VD, Yount BL Jr, Debbink K, Agnihothram S, Gralinski LE, Plante JA, et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat Med*. 2015;21(12):1508-13.
<https://doi.org/10.1038/nm.3985>
19. Wang K, Liu L, Li Y, Xu Q, Wang H, Yang X. Construction of HiBiT-tagged porcine deltacoronavirus via NanoBiT split-luciferase system and its utility in antiviral research. *Vet Microbiol*. 2025;307:110623.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2025.110623>
20. Cheng J, Zhao Y, Xu G, Zhang K, Jia W, Sun Y, et al. The S2 Subunit of QX-type Infectious Bronchitis Coronavirus Spike Protein Is an Essential Determinant of Neurotropism. *Viruses*. 2019;11(10):972.
<https://doi.org/10.3390/v11100972>
21. Whitby SM. The potential use of plant pathogens against crops. *Microbes Infect*. 2001;3(1):73–80.
[https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)01348-4](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)01348-4)
22. Рожнятовский Т, Жултовский З. Биологическая война. Угроза и действительность. М.; 1959.
Rozhnjatovskij T, Zhultovskij Z. *Biological Warfare. Threat and Reality*. Moscow; 1959 (in Russian).
23. Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 2011;12(9):938–54.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
24. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(6):614–29.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
25. Schwelm A, Badstöber J, Bulman S, Desoignies N, Etemadi M, Falloon RE, et al. Not in your usual Top 10: protists that infect plants and algae. *Mol Plant Pathol*. 2018;19(4):1029–34.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12580>
26. Супотницкий МВ. Биологическая война против сельскохозяйственных посевов: исторический аспект и конвенционный контроль. *Вестник войск РХБ защиты*. 2025;9(1):44–56. EDN:vxkuif.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2025-9-1-44-56>
- Supotnitskiy MV. Biological Warfare against Agricultural Crops: Historical Aspects and Conventional Control. *Journal of NBC Protection Corps*. [Vestnik vojsk RHB zashhity]. 2025;9(1):44–56. EDN:vxkuif (in Russian).
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2025-9-1-44-56>
27. Pasin F, Menzel W, Daròs JA. Harnessed viruses in the age of metagenomics and synthetic biology: an update on infectious clone assembly and biotechnologies of plant viruses. *Plant Biotechnol J*. 2018;17(6):1010-26.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13084>
28. Cooper B. Proof by synthesis of Tobacco mosaic virus. *Genome Biol*. 2014;15(5):R67.
<https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-5-r67>
29. Weiss T, Kamalu M, Shi H, Li Z, Amerasekera J, Zhong Z, et al. Viral delivery of an RNA-guided genome editor for transgene-free germline editing in *Arabidopsis*. *Nat Plants*. 2025;11(5):967-76.
<https://doi.org/10.1038/s41477-025-01989-9>
30. Grimsley N, Hohn B, Hohn T, Walden R. «Agroinfection», an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(10):3282-6.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3282>
31. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 1998;16(6):735-43.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>
32. Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, Doskocilova A, Komis G, Samaj J. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol Adv*. 2015;33(6 Pt 2):1024-42.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>
33. Lovato A, Faoro F, Gambino G, Maffi D, Bracale M, Polverari A, Santi L. Construction of a synthetic infectious cDNA clone of Grapevine Algerian latent virus (GALV-Nf) and its biological activity in *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants. *Virol J*. 2014;11:186.
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-186>
34. Becker MM, Graham RL, Donaldson EF, Rockx B, Sims AC, Sheahan T, et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(50):19944-9.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808116105>
35. Ng TF, Chen LF, Zhou Y, Shapiro B, Stiller M, Heintzman PD, et al. Preservation of viral genomes in 700-y-old caribou feces from a subarctic ice patch. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(47):16842-7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1410429111>

36. Yu D, Smith GA, Enquist LW, Shenk T. Construction of a self-excisable bacterial artificial chromosome containing the human cytomegalovirus genome and mutagenesis of the diploid TRL/IRL13 gene. *J Virol*. 2002;76(5):2316-28.
<https://doi.org/10.1128/jvi.76.5.2316-2328.2002>
37. Vashee S, Stockwell TB, Alperovich N, Denisova EA, Gibson DG, Cady KC, Miller K, et al. Cloning, Assembly, and Modification of the Primary Human Cytomegalovirus Isolate Toledo by Yeast-Based Transformation-Associated Recombination. *mSphere*. 2017;2(5):e00331-17.
<https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00331-17>
38. Liu XF, Wang X, Yan S, Zhang Z, Abecassis M, Hummel M. Epigenetic control of cytomegalovirus latency and reactivation. *Viruses*. 2013;5(5):1325-45.
<https://doi.org/10.3390/v5051325>
39. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3132-42.
<https://doi.org/10.1172/JCI35700>
40. Kämmerer U, Pekova S, Klement R. RT-PCR Test Targeting the Conserved 5'-UTR of SARS-CoV-2 Overcomes Shortcomings of the First WHO-Recommended RT-PCR Test. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*. 2023;3(1):818-46.
<https://doi.org/10.56098/ijvtp.v3i1.71>

Вклад авторов / Authors' contridutions

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.В. Супотницкий** – разработка концепции статьи; сбор, анализ и систематизация научной литературы; написание статьи; **Н.В. Шачнева** – подготовка рисунков и редактирование текста / All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **M.V. Supotnitskiy** – elaboration of the concept of the paper; collection, analysis, and systematization of scientific literature; writing and edition of paper; **N.V. Shachneva** – preparation of drawings, editing of the text.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторах / Authors

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации, 111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19.

Супотницкий Михаил Васильевич. Главный специалист Центра, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3193-1032>

Шачнева Наталья Владимировна. Научный сотрудник отдела.

Контактная информация для всех авторов: 27nc_l@mil.ru

Контактное лицо: Супотницкий Михаил Васильевич; 27nc_l@mil.ru

27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation.

Mikhail V. Supotnitskiy. Senior Researcher. Chief Specialist. Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3193-1032>

Natalia V. Shachneva. Researcher of the Department.

Contact information for all authors: 27nc_l@mil.ru

Contact person: Mikhail V. Supotnitskiy; 27nc_l@mil.ru