

Шерматов Шухрат Эрматович

Старший научный сотрудник, к.б.н.

Усманов Дилшод Эркинбаевич

Старший научный сотрудник, PhD

Буриев Забардаст Тожибаевич

Профессор, д.б.н.

Абдурахмонов Иброхим Юлчиевич

Академик

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

e-mail: sshermatov@hotmail.com

УДК: 57:577.2

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ВЕКТОРА pART27 БЕЗ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К КАНАМИЦИНУ

Аннотация: В данной статье приведены результаты разработки модифицированного вектора pART27, используемого в генной инженерии. Путём амплификации, рестрикционного разрезания и лигирования был успешно получен вектор pART27, лишённый гена устойчивости к канамицину (nptII). Разработанный вектор может быть использован для создания трансгенных растений, не содержащих ген nptII в своём геноме.

Ключевые слова: генная инженерия растений, вектор pART27, селективный маркер, nptII.

Shermatov Shuxrat Ermatovich

Katta ilmiy xodim, b.f.n.

Usmanov Dilshod Erkinbayevich

Katta ilmiy xodim, PhD

Buriyev Zabardast Tojibayevich

Professor, b.f.d.

Abdurahmonov Ibrohim Yulchiyevich

Akademik

O'zR FA Genomika va bioinformatika markazi

e-mail: sshermatov@hotmail.com

KANAMITSINGA CHIDAMLILIK GENIDA HOLI BO'LGAN PART27 REKOMBINANT VEKTORINI YARATISH

Annotatsiya: Ushbu maqolada genetik muhandislikda qo'llaniladigan modifikatsiyalangan pART27 vektorini ishlab chiqish natijalari taqdim etilgan. Amplifikatsiya, restriksion kesish va ligaza reaksiyasi orqali kanamitsinga chidamlilik geni (nptII) bo'lmagan pART27 vektori muvaffaqiyatli olindi. Ishlab chiqilgan vektor genomida nptII geni mavjud bo'lmagan transgen o'simliklarni yaratish uchun ishlatilishi mumkin.

Kalit so'zlar: o'simliklar genetik muhandisligi, pART27 vektori, selektiv marker, nptII

Shermatov Shukhrat Ermatovich
Senior scientist, PhD

Usmanov Dilshod Erkinbaevich
Senior scientist, PhD

Buriev Zabardast Tojibaevich
Professor, DSc

Abdurakhmonov Ibrokhim Yulchievich
Academician

Center of Genomics and Bioinformatics, ASU
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

e-mail: sshermatov@hotmail.com

CONSTRUCTION OF A RECOMBINANT PART27 VECTOR LACKING THE KANAMYCIN RESISTANCE GENE

Abstract: This article presents the results of the development of a modified pART27 vector used in genetic engineering. Through amplification, restriction digestion, and ligation, a pART27 vector lacking the kanamycin resistance gene (nptII) was successfully obtained. The developed vector can be used to create transgenic plants that do not contain the nptII gene in their genome.

Keywords: *plant genetic engineering, pART27 vector, selectable marker, nptII.*

Введение

Генная инженерия растений является мощным инструментом, позволяющим создавать сорта сельскохозяйственных культур с новыми полезными признаками, такими как устойчивость к вредителям, болезням, абиотическим стрессам, а также улучшенные питательные качества [1]. Применение таких технологий особенно актуально в условиях роста населения, изменения климата и необходимости повышения продуктивности аграрного сектора. По данным Международной службы по внедрению агробиотехнологий (ISAAA) к 2023 году площади, занятые ГМ-культурами превысили 200 миллионов гектаров [2]. Ключевым элементом создания генетически модифицированного организма (ГМО) является вектор - ДНК-конструкция, обеспечивающая доставку и экспрессию необходимого гена в клетках растений. Большинство векторов включают селективные маркеры, такие как гены устойчивости к антибиотикам или гербицидам [3,4,5]. Однако наличие таких генов в пищевых и кормовых растениях вызывает обеспокоенность у потребителей и регулирующих органов [6]. Один из популярных векторов - pART27 - активно применяется в создании трансгенных растений благодаря своей стабильности, универсальности и возможности высокой экспрессии гена. Вместе с тем, наличие в его составе гена *nptII*, кодирующего устойчивость к канамицину, ограничивает возможности его применения в проектах, где требуется полное отсутствие антибиотик-маркеров. Целью настоящего исследования является разработка модифицированного бинарного вектора pART27, свободного от гена устойчивости к канамицину, с сохранением его способности к экспрессии целевого гена в растительных клетках.

Литературный обзор

Широкое распространение генетически модифицированных растений обусловлено их высокой продуктивностью, устойчивостью к стрессам и

снижением затрат на агротехнику. С момента коммерциализации первых ГМ-культур был разработан ряд векторных систем, обеспечивающих высокоэффективную трансформацию растений. Большинство бинарных векторов, используемых в системе *Agrobacterium tumefaciens*, содержат селективные маркеры. Гены устойчивости к антибиотикам, такие как *nptII*, *hpt* и *aadA*, широко применялись для селекции трансформантов. Однако с начала 2000-х годов стали активно обсуждаться возможные риски, связанные с горизонтальным переносом таких генов в микрофлору почвы, ЖКТ животных и человека. В связи с этим полное исключение селективного маркера уже на этапе конструирования вектора представляет особый интерес.

Gleave A.P. в 1992 году разработал бинарный вектор pART27, который с тех пор стал популярным инструментом для генетической модификации растений с помощью бактерии *Agrobacterium tumefaciens* [7,8,9,10]. Этот вектор отличается высокой стабильностью как в клетках *E. coli*, так и в *Agrobacterium*. Он совместим с различными генетическими элементами экспрессии, управляющими работой встраиваемых генов, например, такими,

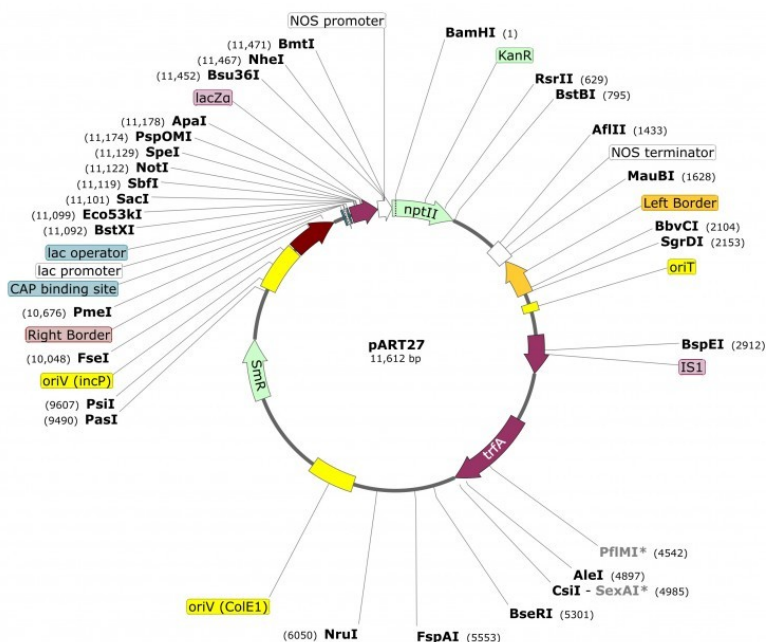


Рис.1. Структура оригинального вектора pART27

как промоторы 35S и NOS. Вектор pART27 содержит RK2 минимальный репликон, обеспечивающий репликацию вектора в клетках *Agrobacterium*

tumefaciens, ColE1 ori для высокой копийности в *Escherichia coli*, и ген устойчивости к спектиномицину/стрептомицину для бактериальной селекции (Рисунок 1). T-DNA участок содержит ген устойчивости к канамицину (*nptII*), окружённый промотором и терминатором *nopaline synthase* (NOS).

Несмотря на свои достоинства, наличие *nptII* ограничивает его использование. Удаление этого гена может сделать вектор pART27 более безопасным и универсальным инструментом для генной инженерии растений.

Методы исследования

Материалом для данного исследования служил вектор pART27, содержащий селективный маркерный ген *nptII*. Для удаления данного гена нами были разработаны две пары праймеров (Таблица 1). Первая пара охватывала участок от терминатора OCS до промотора NOS и включала сайты рестриктаз *AgeI* и *AflIII*. Вторая пара охватывала участок от терминатора NOS до локуса IS1, включая сайты *AflIII* и *BspEI*. Используя вектор pART27 как матрицу, была проведена ПЦП с использованием фермента Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). В результате были получены два ампликона: 794 пар оснований (п.о.) и 1428 п.о. Продукты амплификации проверялись на 1.5% агарозном геле, после чего соответствующие полосы вырезались и очищались с использованием набора PureLink Quick Gel Extraction Kit.

Таблица 1

Список праймеров

Primers name	5'-Seq-3'
FP-F	TATAGCGACATCTATGATAGAGC
FP-R	aaacttaagATTAACGTTTACAATTTCCATTCG
SP-F	aaacttaagGAATTAATTCCAGGCGGTGA
FP-R	GTCATCCATATCACCACGTCA

Далее две очищенные амплифицированные последовательности были соединены в одну с помощью реакции лигирования. Реакция проводилась в общем объёме 20 мкл, содержащем 2 мкл 10× лигазного буфера (Thermo

Fisher Scientific), 1 мкл лигазы (Thermo Fisher Scientific) и 5 мкл смеси ампликонов длиной 794 п.о. и 1428 п.о. Смесь инкубировали в термоциклере при температуре 16 °С в течение 16 часов, затем при 70 °С в течение 20 минут. Получение лигированного продукта длиной 2222 п.о. было подтверждено с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Реакция рестрикции вектора pART27 проводилась в общем объёме 10 мкл с использованием 2 мкл буфера Tango (Thermo Fisher Scientific), 1 мкл рестриктаз AgeI и BspEI (New England Biolabs, США) и 7 мкл вектора pART27. Затем смесь инкубировали при 25 °С в течение 3 часов. Результаты реакции оценивали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле. Из геля был вырезан фрагмент ДНК длиной 9784 п.о., соответствующий вектору pART27. Извлечение ДНК из агарозного геля проводилось с использованием набора PureLink Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции производителя. На данном этапе был получен линеаризованный вектор pART27, не содержащий гена *nptII*.

Реакцию лигирования проводили в общем объёме 20 мкл, содержащем 2 мкл 10× лигазного буфера (Thermo Fisher Scientific), 1 мкл лигазы (Thermo Fisher Scientific), 5 мкл ДНК-фрагмента длиной 2222 п.о. и 12 мкл линейного вектора pART27. Смесь инкубировали в термоциклере при 16 °С в течение 16 часов, затем при 70 °С в течение 20 минут. Полученный продукт оценивали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Соответствующий фрагмент ДНК (вектор pART27, свободный от гена устойчивости к канамицину) был вырезан из геля и очищен с использованием набора PureLink Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции производителя.

Результаты и обсуждение

В рамках настоящей работы нами был успешно сконструирован модифицированный вектор pART27, не содержащий ген *nptII*. Это представляет собой важный шаг в направлении создания трансгенных конструкций, соответствующих современным требованиям к

биобезопасности и тенденциям по ограничению использования генов антибиотикорезистентности в сельском хозяйстве и биомедицине.

Удаление гена *nptII* было достигнуто путём рационального редизайна конструкции - за счёт замены соответствующего фрагмента на специально амплифицированный участок, не содержащий селективного маркера. Результаты гелевого анализа подтвердили успешную сборку конструкции, а точность лигирования и отсутствие несоответствий в длине рекомбинантной молекулы свидетельствуют о высокой эффективности выбранного подхода. Это подтверждает, что методы классического молекулярного клонирования (рестрикция, лигирование, ПЦР) по-прежнему остаются надёжным инструментом при решении задач целенаправленной модификации векторных систем, особенно в условиях, когда необходимо обеспечить полную предсказуемость и контроль над структурой создаваемых конструкций.

Полученный нами новый измененный вектор имеет важное значение в создании ГМ-растений, которые используются в качестве продовольствия или применяются в фармацевтике. Кроме того, отсутствие гена *nptII* открывает возможности для повторного использования трансгенных линий для дальнейших циклов модификации — без риска накопления маркеров в геноме, что важно для сложных программ молекулярной селекции. Также это снижает вероятность возникновения непредсказуемых эффектов, связанных с экспрессией посторонних бактериальных генов в растениях, включая возможное подавление экспрессии целевых генов или активацию неконтролируемых сигнальных путей.

Сравнение полученного подхода с другими методами удаления селективных маркеров показывает его простоту и универсальность. В отличие от систем условного удаления (таких как CRE/loxP или FLP/FRT), требующих дополнительной экспрессии рекомбиназ и, как следствие, второй трансформации, предложенная нами стратегия позволяет изначально

конструировать чистый вектор. Это делает систему более устойчивой, предсказуемой и применимой в условиях ограниченных ресурсов.

Полученные результаты не только демонстрируют возможность эффективного удаления гена *nptII* из вектора pART27, но и создают предпосылки для дальнейшего развития безопасных генетических конструкций для молекулярной биотехнологии.

Выводы

В данной работе был успешно получен модифицированный бинарный вектор pART27, из которого полностью удалён ген устойчивости к канамицину (*nptII*). Используемая стратегия, основанная на комбинации ПЦР и рестрикционно-лигандных подходов, позволила создать вектор, пригодный для трансформации растений без включения селективного маркера *nptII*. Таким образом, модифицированный вектор pART27 без гена *nptII* может служить эффективным и безопасным инструментом в создании трансгенных растений, включая пищевые, кормовые и лекарственные культуры.

Список литературы

1. Abdul Aziz M, Brini F, Rouached H, Masmoudi K. Genetically engineered crops for sustainably enhanced food production systems. *Front Plant Sci* 2022; **13**: 1027828.
2. Applications, International Service for the Acquisition of Agri-biotech. <https://www.isaaa.org/default.asp>.
3. Wilmink A, Dons JJM. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Mol Biol Rep* 1993; **11**: 165–185.
4. Angenon G, Dillen W, Van Montagu M. Antibiotic resistance markers for plant transformation BT - Plant Molecular Biology Manual. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds). . Springer Netherlands: Dordrecht, 1994, pp 125–137.
5. Súnico V, Piunti I, Bhattacharjee M, Mezzetti B, Caballero JL, Muñoz-Blanco J et al. Overview on Current Selectable Marker Systems and Novel Marker

Free Approaches in Fruit Tree Genetic Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25. doi:10.3390/ijms252211902.

6. Rastogi Verma S. Genetically modified plants: public and scientific perceptions. *ISRN Biotechnol* 2013; 2013: 820671.

7. Gleave AP. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol* 1992; 20: 1203–1207.

8. Xia Z, Wang M, Xu Z. The maize sulfite reductase is involved in cold and oxidative stress responses. *Front Plant Sci* 2018; 9: 1680.

9. Sunilkumar G, Campbell LM, Puckhaber L, Stipanovic RD, Rathore KS. Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 18054–18059.

10. Meyer M, Huttenlocher F, Cedzich A, Procopio S, Stroeder J, Pau-Roblot C et al. The subtilisin-like protease SBT3 contributes to insect resistance in tomato. *J Exp Bot* 2016; 67: 4325–4338.