

Шерматов Шухрат Эрматович

Старший научный сотрудник, к.б.н.

Усманов Дилшод Эркинбаевич

Старший научный сотрудник, PhD

Буриев Забардаст Тожибаевич

Профессор, д.б.н.

Адурахмонов Иброхим Юлчиевич

Академик

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

e-mail: sshermatov@hotmail.com

УДК: 57:577.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА КОПИЙ ТРАНСГЕНА МЕТОДОМ QPCR С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОМОТОРА CaMV 35S

Аннотация: В статье представлены результаты определения копийности трансгена в геноме трансгенных растений томата методом qPCR с использованием промотора CaMV 35S. Метод протестирован на растениях T₁-поколения, экспрессирующих S1-белок вируса SARS-CoV-2, и показал высокую точность и воспроизводимость, что делает его эффективным инструментом для молекулярной характеристики трансгенных растений.

Ключевые слова: копийность трансгена, qPCR, промотор CaMV 35S, трансгенный томат.

Shermatov Shuxrat Ermatovich

Katta ilmiy xodim, b.f.n.

Usmanov Dilshod Erkinbayevich

Katta ilmiy xodim, PhD

Buriyev Zabardast Tojibayevich

Professor, b.f.d.

Adurahmonov Ibrohim Yulchiyevich

Akademik

O'zR FA Genomika va bioinformatika markazi

e-mail: sshermatov@hotmail.com

CAMV 35S PROMOTERIDAN FOYDALANIB QPCR ORQALI TRANSGEN NUSXALARI SONINI ANIQLASH

Annotatsiya: Maqolada CaMV 35S promotoridan foydalangan holda qPCR yordamida transgen tomat o'simliklari genomidagi transgen nusxasi sonini aniqlash natijalari keltirilgan. Usul SARS-CoV-2 virusining S1 oqsilini ekspressiyalovchi T₁ avlod o'simliklarida sinovdan o'tkazildi va yuqori aniqlik hamda qayta qo'yilganda bir xil natija berish qobiliyatini ko'rsatdi, bu esa uni transgen o'simliklarning molekulyar tavsifi uchun samarali vositaga aylantiradi..

Kalit so'zlar: transgen nusxasi soni, qPCR, CaMV 35S promoter, transgen tomat.

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

TRANSGENE COPY NUMBER DETERMINATION VIA QPCR TARGETING THE CAMV 35S PROMOTER

Abstract: *This study presents the results of transgene copy number determination in the genome of transgenic tomato plants using qPCR targeting the CaMV 35S promoter. The method was tested on T₁ generation plants expressing the SARS-CoV-2 virus S1 protein and demonstrated high accuracy and reproducibility, making it an effective tool for molecular characterization of transgenic plants.*

Keywords: *transgene copy number, qPCR, CaMV 35S promoter, transgenic tomato.*

Введение

Создание трансгенных растений является важным направлением современной биотехнологии, особенно в условиях необходимости разработки вакцин и биофармацевтических препаратов на растительной основе. Одним из перспективных объектов является томат (*Solanum lycopersicum*), который может служить эффективной системой экспрессии рекомбинантных белков, в том числе антигенов вирусов.

После получения трансгенных растений необходимым этапом является молекулярная характеристика, включающая определение количества копий трансгена, интегрированных в геном. Для определения числа копий в качестве мишени традиционно применяется ген устойчивости к канамицину *nptII*, имеющийся в Т-ДНК области большинства векторных конструкций. Нами предложен альтернативный подход определения числа копий трансгена с помощью промотора CaMV 35S. В рамках наших исследований нами успешно были получены трансгенные растения томата, экспрессирующие S1-белок вируса SARS-CoV-2, которые служили объектом данного исследования.

Целью данной работой являлась оценка числа копий трансгена в геноме растений томата первого поколения (T₁), экспрессирующих S1-белок вируса SARS-CoV-2, с использованием промотора CaMV 35S.

Литературный обзор

Оценка числа копий трансгена, интегрированных в геном является критически важным так как поскольку количество вставленных копий может существенно повлиять на уровень экспрессии гена, стабильность трансгена, проявление фенотипа, а также риск сайленсинга вследствие множественных вставок [1, 2, 3]. Кроме того, необходимо подчеркнуть, что для селекционных программ желательным является наличие в геноме растений только одной копии трансгена, так как единственную копию легче характеризовать генетически и контролировать в процессе дальнейшего отбора.

В научной литературе описаны различные подходы определения числа копий трансгена, включая количественную ПЦР в реальном времени (qPCR), цифровую ПЦР (dPCR), блоттинг по Саузерну, а также парное концевое полногеномное секвенирование (paired-end whole-genome sequencing, PE-WGS) [4, 5]. Из них qRT-PCR на сегодняшний день является одним из наиболее популярных методов из-за высокой чувствительности, скорости и относительно невысокой стоимости. Традиционно в исследованиях по определению копийности трансгена в качестве целевого элемента часто используется ген *nptII*, кодирующий неомицинфосфотрансферазу II, поскольку он входит в большинство генетических конструкций и обеспечивает устойчивость к канамицину. Данный ген используется для проведения отбора трансформантов, получаемых через клеточную культуру.

Однако современные требования к биобезопасности побуждают исследователей к разработке генетических конструкций, свободных от гена *nptII*. В связи с этим возрастает интерес к новым методам, не зависящим от наличия гена устойчивости к канамицину. Одним из таких решений является использование в качестве мишени промотора 35S вируса мозаики цветной

капусты (CaMV 35S), который представляет собой конститутивный регуляторный элемент и включается во многие растительные экспрессионные конструкции. Несмотря на то, что сам промотор не кодирует белок, его стабильная интеграция, высокая представленность и специфичность последовательности делают его удобным объектом для qPCR-анализа.

Как известно, корректный выбор контрольного эндогенного гена является ключевым условием для точного и воспроизводимого определения копийности трансгена. Он служит точкой отсчёта при сравнении относительного количества трансгенной вставки. В исследованиях на томате было показано, что ген *LAT52* содержится в данном растении в стабильной одной копии [6, 7].

Таким образом, использование CaMV 35S в сочетании с валидированным эндогенным одно-копийным геном представляет собой эффективную стратегию количественной оценки трансгенной вставки, особенно в случае конструкций без традиционных генов устойчивости к канамицину. В настоящем исследовании для определения копийности трансгена использован именно этот подход.

Методы исследования

Материалы

Для данного исследования использована Т-ДНК генетического вектора pART27 содержащая последовательности S1 гена вируса SARS-CoV-2, промотор CaMV 35S, маркер 3xFLAG, метка 8xHis и терминатор OCS, которая была трансформирована в растение томата (*Solanum lycopersicum*). Число копий трансгена определяли у трех трансгенных линий томата T₁-поколения из различных трансформационных событий. В качестве контроля использовали не трансформированное растение томата.

Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из молодых листьев растений выделяли с

использованием DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, США) согласно инструкции производителя. Концентрацию и качество ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoPhotometer NP80 (Implen GmbH, Германия) и геле-электрофореза в 0.9% агарозном геле.

Олигонуклеотидные праймеры

Праймеры и зонды (Таблица 1) были конструированы с помощью Primer3 и IDT OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies Inc., США). Кроме того, часть праймеров были получены из научной литературы [7, 8]. Все праймеры и пробы были синтезированы в компании IDT OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies Inc., США). Пары праймеров NTD_1f_qPCR/ NTD_1r_qPCR в сочетании с зондом NTD_1probe, а также RBD_2F_qPCR /RBD_2R_qPCR в сочетании с зондом RBD_2probe были использованы для количественной ПЦР на NTD и RBD субъединиц S1, что позволило получить амплифицированные фрагменты длиной 98 и 100 п.о. соответственно. Пары праймеров NAD-5-F/NAD-5-R в сочетании с зондом NAD-5-Probe использовались для амплификации гена субъединицы 5 митохондриальной НАДН-дегидрогеназы, который служил внутренним положительным контролем качества ДНК томата. Пары праймеров LAT52_F/LAT52_R в сочетании с зондом LAT52_P, специфичные к одно-копийному ядерному гену томата *LAT52*, были использованы в качестве эндогенного контрольного гена для нормализации данных при оценке копийности трансгена. Праймеры 35S-F и 35S-R, а также специфичный TaqMan-зонд (probe_35S) использовали для определения копийности вставки. В качестве флуоресцентных репортерных красителей для TaqMan-зондов использовались 6-FAM, HEX и VIC, а в качестве гасителя флуоресценции применялся BHQ1.

Таблица 1

Праймерные пары и флуоресцентные зонды для ПЦР, векторной конструкции и количественного ПЦР реального времени

Название	Ориен	Последовательность (5'-3')	Дли	Размер	Ссыл
----------	-------	----------------------------	-----	--------	------

тация			на(н)	амплико на size (по)	ка
NTD_1f_qPCR	Прямой	CTCAGGACTTGTTCCTTACCTTTCT	24	98	Данно е иссл.
NTD_1r_qPCR	Обрат.	GACAGGGTTATCAAACCTCTTAGT	24		
NTD_1probe	Зонд	6-FAM- TCCATGCTATACATGTCTCTGGGAC CA-BHQ1	27		
RBD_2F_qPCR	Прямой	AGAGGTGATGAAGTCAGACAAAT	23	100	Данно е иссл.
RBD_2R_qPCR	Обрат.	AAGCTATAACGCAGCCTGTAA	21		
RBD_2probe	Зонд	HEX- CCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCT -BHQ1	24		
LAT52_F	Прямой	AGACCACGAGAACGATATTTGC	22	92	Yang <i>et al.</i> [7]
LAT52_R	Обрат.	TTCTTGCCTTTTCATATCCAGACA	24		
LAT52_P	Зонд	FAM6- CTCTTTGCAGTCCTCCCTTGGGCT- BHQ1	24		
NAD-5-F	Прямой	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT	23	181	Menze l <i>et al.</i> [8]
NAD-5-R	Обрат.	CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA	24		
NAD-5-Probe	Зонд	VIC- AGGATCCGCATAGCCCTCGATTTAT GTG-BHQ1	28		
35S-F	Прямой	GTGGCTCCTACAAATGCCATCAT	23	135	Данно е иссл.
35S-R	Обрат.	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC	22		
probe_35S	Зонд	VIC- CAAAGATGGACCCCCACCCACG- BHQ 1	22		

NTD – терминальный домен спайк белка SARS-CoV-2; RBD – рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2; NAD-5 – Праймеры внутреннего контроля в гене субъединицы 5 митохондриальной НАДН-дегидрогеназы; LAT52 – ген LAT52 томата; 35S – промотор CaMV 35S .

Условия ПЦР

Реакции количественной ПЦР в реальном времени (qRT–PCR) проводили на системе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Амплификация выполнялась в объеме 12,5 мкл с использованием стандартной программы, рекомендованной производителем: 95 °C в течение 10 минут, затем 40 циклов по следующему профилю — 95 °C в течение 15 секунд, 60 °C в течение 1 минуты и 72 °C в течение 1 минуты. Каждая реакционная смесь (12,5 мкл) содержала: 6,25 мкл Master Mix (2×), по 0,25 мкл каждого праймера (10 мкМ, конечная концентрация — 200 нМ), 1

мкл зонда (0,5 мкМ, конечная концентрация — 40 нМ), 4 мкл образца геномной ДНК (в диапазоне от 0,2 пг до 20 нг) и 0,75 мкл стерильной деионизированной воды.

Вычисление количества копий трансгена

Число копий вычислялось по уравнению:

$$X_0/R_0 = 10[(Ct, X-IX)/SX)]-[(Ct, R-IR)/SR],$$

где X - целевой ген 35S, R - референтный эндогенный ген *Sl_Lat52*, I - пересечение с осью ординат (интерсепт), а S - наклон стандартной кривой для соответствующего гена. Отношение X_0/R_0 использовали непосредственно для оценки числа копий в растениях поколения T₁. Коэффициент вариации (CV) оценок копий рассчитывался на основе коэффициентов вариации индивидуальных оценок для *Sl_Lat52* и 35S.

Результаты и обсуждения

Выбор одно-копийного эндогенного референтного гена

Для точной оценки копийности трансгена в геноме трансгенных растений методом qPCR необходимо использовать эндогенный контрольный ген, представленный в геноме в единственном экземпляре. Это обеспечит точность и валидность результатов qPCR и позволит получить надёжное соотношение Ct и корректное вычисление X_0/R_0 . В качестве такого гена был выбран *Lat52*, известный своей специфичностью для томата и стабильной одно-копийностью [6, 7]. Данный ген кодирует предполагаемый белок массой 18 кДа, обогащённый остатками цистеина и содержащий гидрофобный N-концевой участок, обладающий характеристиками, сходными с сигнальной последовательностью, типичной для секретируемых белков эукариот. Было доказано, что *Lat52* присутствует в геноме томата в одной копии.

Определение копийности трансгена.

Мы использовали методологию количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) и соответствующие расчёты для оценки числа копий

вектора *pART27::COVID-19_S1*, интегрированного в геном трансформированных растений томата T₁-поколения. В качестве целевого гена был использован промотор CaMV 35S, а в качестве эндогенного одно-копийного контрольного гена - *LAT52*, специфичный для томата. Для построения стандартных кривых использовали серию десятикратных разведений плазмидной ДНК, содержащей как CaMV 35S, так и *LAT52*. Стандартные кривые демонстрировали высокую линейность ($R^2 = 0,996$ для 35S и $R^2 = 0,998$ для *LAT52*) и высокую эффективность амплификации: 107% и 96,45% соответственно. Эти данные подтверждают надёжность и воспроизводимость методики (Таблица 2).

Таблица 2

Калибровочная кривая для промотора CaMV 35S и специфичного для томата гена *Sl_Lat52*, построенная на основе плазмидного вектора *pART27-Sl_Lat52*

Количество ДНК		Сре	SD	SE	CV	Накло	Intercep	R2	Efficiency*
нг	копия	д- знач. Ct *			(%)	н	t		*
Промотор 35S						-3.16	35.49	0.996	107%
20	1319088116	8.45	0.11	0.05	0.01				
2	131908811	12.15	0.21	0.09	0.02				
0.2	13190881	14.30	0.45	0.19	0.03				
0.02	1319088	17.55	0.25	0.10	0.01				
0.002	131908	21.32	0.35	0.15	0.02				
0.0002	13190	24.45	0.48	0.20	0.02				
Solanum lycopersicum_LAT52						-3.41	34.56	0.998	96.45%
20	1319088116	7.56	0.12	0.05	0.02				
2	131908811	11.22	0.78	0.33	0.07				
0.20	13190881	14.25	0.42	0.18	0.03				
0.02	1319088	18.45	0.65	0.27	0.04				
0.002	131908	21.25	0.7	0.3	0.0				

			2	0	3
0.000	13190	24.56	0.5	0.2	0.0
2			6	3	2

SD – стандартное отклонение; SE – стандартная ошибка = $SD / \sqrt{n}$, где n – размер выборки; *реакция qRT-PCR для каждой точки разведения проводилась шесть раз, в таблице представлены средние значения; **эффективность ПЦР рассчитывалась по формуле: $E = 10^{(-1/\text{Slope})} - 1$ и представлена в процентах.

Для анализа были выбраны три трансгенные линии T₁-поколения, полученные из независимых трансформационных событий. Средние значения Ct для CaMV 35S в образцах Promoter_1, Promoter_4 и Promoter_8 составили 24,54, 28,73 и 28,38 соответственно, тогда как в контрольном нетрансформированном образце - 36,41 (Таблица 3). Эти данные, в совокупности с результатами по LAT52, позволили вычислить соотношение X_0/R_0 , отражающее относительное количество копий трансгена в геноме.

Таблица 3

Оценочное количество копий промотора CaMV 35S в трансгенных линиях томата первого поколения (Т₁)

Образцы	Сред. знач. Ct *	SD	SE	CV(%)	X ₀ /R ₀ **	Предполагае мое число копий	CV***	CV bruto
CaMV 35S Promoter_1	24.54	0.16	0.07	0.01	3.1015789127473816	3	0.006634695936334784	0.006
CaMV 35S Promoter_4	28.73	0.21	0.09	0.01	1.1329128898450334	1	0.010066647960943882	0.010
CaMV 35S Promoter_8	28.38	0.76	0.32	0.03	1.2266189715032605	1	0.027054929004352853	0.027
CaMV 35S Promoter_control	36.41	0.56	0.23	0.02	0.004799196873686667	0	0.016237701820819836	0.016
Lat52_1	24.42	0.03						
Lat52_4	27.45	0.19						
Lat52_8	27.19	0.16						
Lat52_control	26.89	0.14						

SD - стандартное отклонение; SE - стандартная ошибка [SD/SQRT(n)]; CV - коэффициент вариации [SD / среднее значение]; *реакция qRT-PCR для каждой пробы проводилась шесть раз, в таблице приведены средние значения; ** $X_0/R_0 = 10^{[(Ct, X - I_X)/S_X] - [(Ct, R - I_R)/S_R]}$, где X - промотор CaMV 35S, R - LAT52, I - точка пересечения стандартной кривой, S – наклон стандартной кривой для целевого (X) и референсного (R) генов; ***коэффициент вариации при оценке числа копий рассчитывался на основе коэффициентов вариации для LAT52 (эндогенный контроль) и промотора CaMV 35S (целевой ген) по формуле: $s = (cv) \times (\text{среднее значение}_{CaMV 35S} / \text{среднее значение}_{LAT52})$, где $cv = \text{SQRT} [(CV_{CaMV35S})^2 + (CV_{LAT52})^2]$.

Расчёт числа копий показал, что в растениях Promoter_1 содержится 3 копии вставки, в Promoter_4 - 1 копия, а в Promoter_8 - 1 копия. У контрольного растения трансген не был обнаружен ($X_0/R_0 = 0,0048$; копияность = 0), что подтверждает специфичность анализа. Коэффициенты вариации для оценки копияности были низкими ($CV_{bruto} < 0.03$), что указывает на высокую точность измерений.

Таким образом, представленные результаты демонстрируют вариабельность числа копий трансгена между различными трансформационными событиями и эффективность предлагаемой методики количественной ПЦР в определении копияности.

Выводы

В настоящем исследовании была успешно реализована методика определения числа копий трансгена в растениях томата поколения T₁ с использованием количественной ПЦР в реальном времени (qPCR), нацеленной на промотор CaMV 35S. Данный подход продемонстрировал высокую чувствительность, специфичность и воспроизводимость. Использование промотора 35S в качестве универсального целевого элемента в сочетании с валидированным одно-копийным эндогенным геном томата позволяет надёжно и эффективно оценивать копияность трансгенной вставки без необходимости включения в конструкцию гена устойчивости к канамицину.

Список литературы

1. Hirai S, Takahashi K, Abiko T, Kodama H. Loss of sense transgene-induced post-transcriptional gene silencing by sequential introduction of the same transgene sequences in tobacco. FEBS J. 2010;277:1695–703.5.
2. Tang W, Newton RJ, Weidner DA. Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine. J Exp Bot. 2007;58:545–54.

3. Rajeevkumar S, Anunanthini P, Sathishkumar R. Epigenetic silencing in transgenic plants. *Front Plant Sci.* 2015;6:693.
4. Xu W, Liang J, Wang F, Yang L. Comparative evaluation of gene copy number estimation techniques in genetically modified crops: insights from Southern blotting, qPCR, dPCR and NGS. *Plant Biotechnol J.* 2024;22:3456–8.6.
5. Liu F, Cheng J, Liu X, Wang X-Q. High-throughput and accurate determination of transgene copy number and zygosity in transgenic maize: From DNA extraction to data analysis. *Int J Mol Sci.* 2021;22:12487.7.
6. Twell D, Wing R, Yamaguchi J, McCormick S. Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol Gen Genet.* 1989;217:240–5.4.
7. Yang L, Pan A, Jia J, Ding J, Chen J, Cheng H, et al. Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes. *J Agric Food Chem.* 2005;53:183–90.3.
8. Menzel W, Jelkmann W, Maiß E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J Virol Methods.* 2002;99:81–92.2.