

## КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 557.11.113:579.254.26:633.71:633.4

doi: 10.17223/19988591/32/8

Н.В. Пермякова<sup>1</sup>, Е.В. Дейнеко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский  
Томский государственный университет, г. Томск, Россия

### Фрагменты векторной ДНК, интегрирующиеся в геном трансгенных растений моркови при агробактериальной трансформации

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН VI.62.1.5. «Разработка и совершенствование генетических конструкций для оптимизации экспрессии целевых генов и синтеза рекомбинантных белков медицинского назначения у трансгенных растений и животных».

Установлено, что при агробактериальной трансформации в геном трансгенных растений могут быть интегрированы не только Т-ДНК, включающие кассеты экспрессии с целевыми генами, но и участки нуклеотидных последовательностей, лежащие за пределами Т-ДНК. В результате анализа геномной ДНК, выделенной из 119 трансгенных растений моркови (*Daucus carota* L.), выявлена частота переноса векторных ДНК в геном трансгенных растений, которая составила 36,1%. Анализ векторных последовательностей свидетельствовал о том, что обе границы Т-ДНК могут быть определены эндонуклеазами и вырезаны неправильно. Однако наиболее важным этапом процессинга Т-ДНК остается осуществление точного надреза в области правого концевой повтора. Показано, что в одно и то же растение, кроме Т-ДНК, вырезанной с ошибкой, может встраиваться и последовательность вектора, не зависящая от Т-ДНК. С помощью секвенирования подтверждены перенос и встраивание в геном трансгенных растений генов, находящихся за пределами Т-ДНК.

**Ключевые слова:** трансгенные растения; краевые векторные последовательности; встраивание Т-ДНК, *Agrobacterium tumefaciens*.

### Введение

Агробактериальная трансформация – один из наиболее широко используемых методов введения чужеродных генов в геном не только двудольных, но и некоторых однодольных видов растений. Гены, представляющие интерес для исследователя, клонируются между двумя несовершенными краевыми повторами Т-ДНК (левым и правым), единственными элементами в *цис*-положении,

необходимыми для переноса. Оба повтора опознаются в бактериальной клетке белками *vir*-комплекса VirD1/VirD2. Белок VirD2 осуществляет одноцепочечный надрез, обычно между 3-м и 4-м нуклеотидами краевого повтора. Затем, начиная со свободного 3' конца (надрез в области правого краевого повтора), путем замещения «нижней» нити ДНК образуется одноцепочечная нить Т-ДНК (Т-нить). Белок VirD2, выполняющий роль транспортного белка, доставляет Т-нить из бактериальной клетки в растительную [1].

До середины девяностых годов общепринятым оставалось представление о том, что в растительную клетку переносится только Т-ДНК, заключенная между краевыми повторами. Однако рядом исследователей было показано, что это не всегда так [2, 3]. Установлено, что перенос пограничных векторных последовательностей в растительный геном происходит достаточно часто и не зависит от вида трансгенных растений, использованных векторов (коинтегративные, бинарные) и типов присутствующих в генетической конструкции краевых участков (нопалиновые, октопиновые) [4–10]. Более того, в геноме трансгенных растений выявлялись различные типы векторных последовательностей, часть из которых интегрировалась в геном в виде последовательностей, сцепленных с Т-ДНК, тогда как часть других – независимо от Т-ДНК [4, 7, 9].

В настоящее время существуют две гипотезы, объясняющие возможный механизм переноса векторных последовательностей, основанные на ошибках опознавания белками *vir*-комплекса правого и левого повторов, фланкирующих Т-ДНК. В случае если левый концевой повтор не опознается белками *vir*-комплекса, то процессинг Т-ДНК не прерывается (проскакивается) на левом концевом повторе и вслед за Т-ДНК реплицируется векторная последовательность, сцепленная с Т-нитью [6, 9]. Согласно второй гипотезе левый концевой повтор неправильно опознается (как правый) и репликация ДНК начинается с него, проходит всю векторную последовательность, затем, минуя правый концевой повтор, проходит всю Т-ДНК и оканчивается на левом повторе [5, 10].

Встраивание векторных последовательностей в геном трансгенных растений представляется нежелательным явлением. Нуклеотидные последовательности прокариотического происхождения, интегрированные в растительный геном, подвергаются метилированию и, таким образом, инактивируются как чужеродные [11]. Метилирование чужеродных последовательностей, сцепленных с Т-ДНК, влияет у трансгенных растений на стабильность экспрессии перенесенных генов [8, 12]. Известны примеры, когда повторяющиеся участки, или *ori*-репликации, содержащиеся в векторной ДНК, стимулировали перестройки внутри инсерции Т-ДНК [13, 14]. Наличие векторных последовательностей затрудняет исследование районов растительной ДНК, прилежащих к Т-ДНК. Кроме того, перенос в растительный геном генов устойчивости к антибиотикам или селективных маркеров, входящих в состав векторной последовательности, также представляется нежелательным.

В настоящее время трансгенные растения широко используются в мире для различных целей, в том числе и как источники различных рекомбинантных белков (антител, цитокинов, факторов роста, гормонов, рекомбинантных ферментов, а также человеческих и ветеринарных вакцин) [15, 16]. Растения, которые можно употреблять в пищу без предварительной обработки, предоставляют широкие возможности для производства биофармацевтических препаратов. Ранее нами были получены трансгенные растения моркови, продуцирующие интерлейкины 10 и 18 человека, белки-иммуногены CFP10 и ESAT6 *Mycobacterium tuberculosis*, а также S- и М-антигены вируса гепатита В [17–19]. Согласно правилам коммерциализируемые сорта трансгенных растений не должны содержать никаких последовательностей векторной ДНК, лежащей за пределами Т-ДНК. В связи с этим выяснение частоты, с которой могут быть отобраны трансгенные растения, несущие в геноме фрагменты векторной ДНК, уточнение механизмов и особенностей их встраивания представляется актуальным и определяет цель настоящей работы.

### Материалы и методики исследования

В качестве исходного материала было использовано 119 трансгенных ( $T_0$ ) растений моркови, содержащих маркерный ген неомицинфосфотрансферазы II (*nptII*) и целевые гены интерлейкина-18 человека, иммуногенов *M. tuberculosis* и вируса гепатита В. Все конструкции для трансформации растений были созданы на основе плазмиды pBI121. Трансгенные растения были получены стандартным методом агробактериальной трансформации [20]. Растительную ДНК выделяли стандартным методом [Там же].

Правый и левый концевые повторы Т-ДНК расположены в плазмиде pBI121 между 2454–2478 и 8621–8646 пн соответственно. Общая протяженность последовательности ДНК плазмиды pBI121, расположенной за пределами Т-ДНК, 8600 пн, она содержит восемь генов и два сайта инициации репликации.

Для детального анализа схемы встраивания векторных фрагментов в геном трансгенных растений при помощи программы Oligo был сконструирован ряд праймеров. Используемые в работе праймеры представлены в табл. 1. Схема расположения мест прикрепления всех пар праймеров приведена на рис. 1. Праймеры на векторную ДНК BD1/2, BD3/4, BD5/6, BD 7/8 и BD 9/10 использовались в мультиплексном ПЦР конкурентно с двумя другими парами праймеров – на ген *nptII* и ген моркови, кодирующий экстенсин.

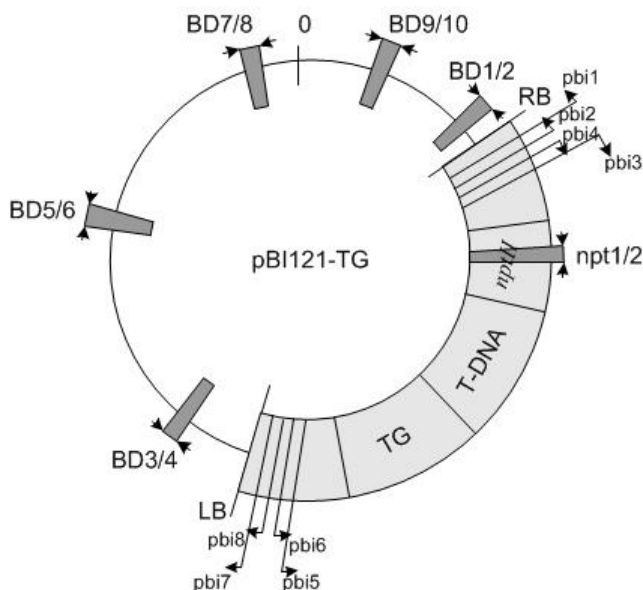
Реакционная смесь для амплификации объемом 20 мкл содержала: 60 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1,5 mM  $MgCl_2$ ; 25 mM KCl; 10 mM 2 – меркаптоэтанол; 0,1% Тритон X-100; 0,2 mM каждого dNTP; по 0,25 pM праймера на векторную ДНК; по 0,12 pM праймера на геномную ДНК моркови соответственно; по 0,12 pM праймера на ген неомицинфосфотрансферазы; 2 ед. термостабильной Taq-ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Новосибирск); 30 нг выделенной ДНК.

Т а б л и ц а 1 [Table 1]

**Праймеры, используемые в эксперименте. Начальная позиция фрагмента  
указана относительно сайта инициации репликации плазмиды pBI121**  
[PCR primers used in this study.

**Starting position of the fragment is relative to the *ori* of plasmid pBI121]**

Обозначение фрагмента [Target]	Последовательность праймеров 5'-3' [Primer sequence 5'-3']	Началь- ная пози- ция (пн) [Starting position]	Длина фрагмен- та (пн) [Fragment length]
Фрагмент BD1/2, прилежащий к RB [Fragment BD1/2 adjacent to the RB]	BD1 ACGTGAAACCCAACATACCC BD2 ATGTGCATGCCAACACAG	1809 nt	284 bp
Фрагмент BD3/4, прилежащий к LB [Fragment BD3/4 adjacent to the LB]	BD3 GATACAGGCAGCCCATCAGTC BD4 TAGCGCCACTCAGCTTCCTCAG	8698 nt	331 bp
Фрагмент BD5/6 в середине векторной ДНК, ближе к LB [Fragment BD5/6 in the center of the vector sequence closer to the LB]	BD5 GCAATGAAGTCGGTCCC BD6 GCGGACAAGTGGTATGAC	11 494 nt	348 bp
Фрагмент BD7/8 в середине векторной ДНК, ближе к RB [Fragment BD7/8 in the center of the vector sequence closer to the RB]	BD7 CGCCATGAAGTCCGTGAATG BD8 TAAGTGCCCTGCGGTATTGA	13 867 nt	582 bp
Фрагмент BD9/10 в середине векторной ДНК, ближе к RB [Fragment BD9/10 in the center of the vector sequence closer to the RB]	BD9 CTGACGCCGTTGGATACAC BD10 GCTCACTCAAAGCGGTAAT	661 nt	519 bp
Ген <i>nptII</i> из T-ДНК области [Gene <i>nptII</i> , from T-DNA region]	<i>npt1</i> CGACGTTGTCACTGAAGCG <i>npt2</i> AAGCACGAGGAAGCGGTCAG	3080 nt	487 bp
Хозяйский ген моркови, кодирующий экстенсин [Carrot host gene encoding extensin]	<i>car1</i> ACCTCCTCCTCCTCACCCTAC <i>car2</i> TAAGTTGGCCTCCATCAGTGTC		249 bp
Ген <i>ftsA</i> <i>A. tumefaciens</i> [ <i>A. tumefaciens</i> gene <i>ftsA</i> ]	A <sub>1</sub> CATGATCGGCCGGCTGACA A <sub>2</sub> TGCGCAGGTGCGTTGCTTC	2007165 nt	277 bp
Праймеры для секвенирования [Primers for sequencing]	<i>pbi1</i> GACCTGCAGTCTCATATTCACCTCTCAATCC	2783 nt	
	<i>pbi2</i> GATGGATCCATAAATCCCCCTCGGTATCCA	2754 nt	
	<i>pbi3</i> GACCTGCAGTCGTTTCCCGCCTTCAGT	2513 nt	
	<i>pbi4</i> GATGGATCCTTAATTCCTCGCTCATGATC	2540 nt	
	<i>pbi5</i> GACGGATCCACTACGTGAACCATCAC	8294 nt	
	<i>pbi6</i> CACGGATCCGTCTATCAGGGCGATGG	8314 nt	
	<i>pbi7</i> GACGGATCCAACGTCCGCAATGTGTATTAAAG	8581 nt	
	<i>pbi8</i> CACAAGCTTGCCCGTCTCACTGGTGA	8535 nt	



**Рис. 1.** Схема мест посадки праймеров в конструкции, использованной для создания трансгенных растений, созданной на основе плазмиды pBI121. Область Т-ДНК (T-DNA) выделена светло-серым цветом. Обозначения: *nptII* – ген неомизинфосфотрансферазы II *Escherichia coli*; TG – целевой ген; LB, RB – повторы, окаймляющие Т-ДНК; 0 – *ori* репликации; BD1/2, BD3/4, BD5/6, BD7/8, BD9/10 – праймеры на векторные последовательности; pbi1, pbi2, pbi3, pbi4, pbi5, pbi6, pbi7, pbi8 – праймеры для секвенирования; npt1/2 – праймеры на ген неомизинфосфотрансферазы II *Escherichia coli* [Fig. 1. Location of the primers in the construction used for generating transgenic plants produced on the basis of the plasmid pBI121. T-DNA region is colored light gray. Abbreviations: *nptII*, gene encoding *Escherichia coli* neomycin phosphotransferase II; TG – target gene; LB and RB, the repeats encompassing T-DNA; 0, *ori*; BD1/2, BD3/4, BD5/6, BD7/8, and BD9/10 are primers for vector sequences; pbi1, pbi2, pbi3, pbi4, pbi5, pbi6, pbi7, and pbi8 are primers for sequencing; and; npt1/2, primers for *Escherichia coli* neomycin phosphotransferase II]

Амплификация осуществлялась в следующем режиме: денатурация 3 мин при 95°C, отжиг праймеров 30 с при 60°C, элонгация 1 мин при 72°C для первых 3 циклов, затем денатурация 30 с при 95°C, отжиг праймеров 30 с при 62°C, элонгация 1 мин при 72°C для последующих 32 циклов. Все амплификации проводились в программируемом амплификаторе «Терцик» фирмы «ДНК Технологии».

Для того чтобы исключить присутствие в анализируемых образцах почвенной бактерии *A. tumefaciens*, дополнительно использовали праймеры на фрагмент ДНК *A. tumefaciens*. Реакционная смесь объемом 15 мкл имела состав, аналогичный составу, описанному для ПЦР с праймерами на векторные последовательности. Амплификация осуществлялась в следующем режиме: 1 цикл денатурация 3 мин при 95°C, отжиг праймеров 30 с при 64°C,

элонгация 1 мин при 72°C, следующие 3 цикла, затем денатурация 40 с при 95°C, отжиг праймеров 30 с при 64°C, элонгация 1 мин при 72°C и затем денатурация 40 с при 95°C, отжиг праймеров 30 с при 62°C, элонгация 1 мин при 72°C для последующих 28 циклов.

Разделение продуктов ПЦР-реакции проводилось путем электрофореза в 6%-ном акриламидном геле. Был выбран полиакриламидный гель, поскольку он является более подходящим, чем агарозный, для разделения фрагментов ДНК, близких по длине.

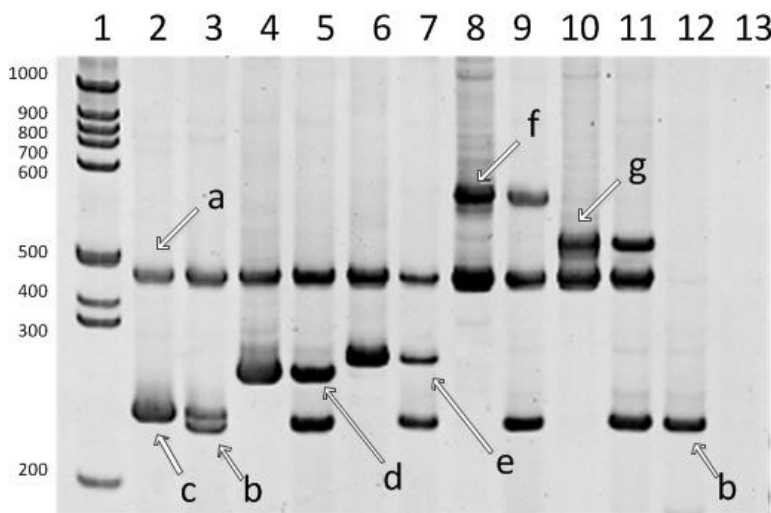
Для уточнения взаиморасположения фрагментов векторной ДНК относительно Т-ДНК у растений моркови № 33/2 и № 106 участки векторной ДНК были секвенированы. Клонирование и секвенирование фрагментов векторной ДНК проводилось методом «инвертированной» ПЦР [21].

Для секвенирования геномную ДНК трансгенных растений (100–200 нг) гидролизovali эндонуклеазами рестрикции TaqI, MspI, Bsp19I или EcoRI, смесь экстрагировали фенолом. ДНК растворяли в лигазном буфере (50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотрейтол, 1 мМ АТР) (1–2 нг/мкл) и подвергали самолигированию в течение ночи при температуре 8°C. ДНК осаждали этанолом, растворяли в воде и использовали в качестве матрицы для ПЦР. ПЦР проводили в 50 мкл буфера, содержащего 67 мМ Tris-HCl (pH8,9), 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Tween 20, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 100 мкМ dNTP, 1 мкМ праймеров, 2 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Амплификацию осуществляли в течение 32 циклов в следующем режиме: денатурация 1 мин при 94°C, отжиг праймеров 1 мин при 52°C для первого цикла и 30 с при 62°C для всех последующих циклов, элонгация 3 мин при 72°C. Далее 1/10 амплификационных смесей использовали для второго раунда амплификации с «внутренними» праймерами в аналогичных условиях ПЦР. Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов ДНК определяли с использованием «ABI PRISM Big Dye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit» (Amersham, UK). Полученные с помощью секвенирования последовательности ДНК были проанализированы методом BLAST по базе данных GenBank.

### Результаты исследования и обсуждение

Результаты нашего исследования показали, что вследствие ошибок процессинга Т-ДНК в геном трансгенных растений переносятся различные фрагменты векторной ДНК. Фрагменты могут быть как совсем небольшими (300–400 пн), так и включать в себя всю векторную последовательность целиком (8 600 пн для плазмиды pB121). На рис. 2 представлена электрофореграмма разделения продуктов амплификации геномной ДНК трансгенных растений моркови. В каждой реакции амплификации участвовало одновременно три пары праймеров – праймеры на ген *nptII*, праймеры на ген экстенсина (хозяйский ген из генома моркови) и одна из пар праймеров

на векторную последовательность. Продукты амплификации, обозначенные на дорожках буквой *a*, соответствуют маркерному гену *nptII*, что свидетельствует о трансгенном статусе анализируемых растений. Фрагменты геномной ДНК, обозначенные на дорожках буквой *b*, соответствуют гену экстенсина, что подтверждает наличие в образцах геномной ДНК из растений моркови. Продукты амплификации, обозначенные буквами *c*, *d*, *e*, *f*, *g*; соответствуют фрагментам векторной ДНК: *c* – фрагменту BD1/2; *d* – фрагменту BD3/4; *e* – фрагменту BD5/6; *f* – фрагменту BD7/8 и *g* – фрагменту BD9/10.



**Рис. 2.** Взаиморасположение фрагментов, получаемых в результате ПЦР реакций и их последующего разделения путем электрофореза в 6%-ном акриламидном геле. Обозначения: *a* – фрагмент гена *nptII*; *b* – фрагмент гена экстенсина из генома моркови; *c* – векторный фрагмент BD1/2; *d* – векторный фрагмент BD3/4; *e* – векторный фрагмент BD5/6; *f* – векторный фрагмент BD7/8; *g* – векторный фрагмент BD9/10. На дорожках: 1 – маркер 100 пн (Медиген, Россия), указана длина каждого фрагмента; 2, 4, 6, 8 и 10 – в виде матрицы использовалась ДНК плазмиды pBi121, ПЦР с праймерами *nptII*, хозяйский ген моркови и BD1/2, BD3/4, BD5/6, BD7/8, BD9/10 (соответственно); 3, 5, 7, 9 и 11 – в виде матрицы использовалась ДНК трансгенных растений моркови, ПЦР с праймерами *nptII*, хозяйский ген моркови и BD1/2, BD3/4, BD5/6, BD7/8, BD9/10 (соответственно); 12 – в виде матрицы использовалась ДНК нетрансгенного растения моркови; 13 – отрицательный контроль, без матрицы

[Fig. 2. Fragments obtained by PCR and their subsequent electrophoretic fractionation in 6% acrylamide gel. Arrows: *a*, fragment of *nptII* gene; *b*, fragment of carrot host gene encoding extensin; *c*, vector fragment BD1/2; *d*, vector fragment BD3/4; *e*, vector fragment BD5/6; *f*, vector fragment BD7/8; *g*, vector fragment BD9/10. Lanes: 1, DNA-marker 100bp (Medigen, Russia), lengths of the fragments (bp) are indicated rightward; 2, 4, 6, 8 and 10 - DNA of plasmid pBi121 with primers for *nptII*, car and BD1/2, BD3/4, BD5/6, BD7/8, BD9/10 (correspondingly); 3, 5, 7, 9 and 11, DNA of transgenic carrot plant, PCR with primers *nptII*, car and BD1/2, BD3/4, BD5/6, BD7/8, BD9/10 (correspondingly); 12, DNA of nontransgenic carrot plant; 13, negative control (without template)]



Т а б л и ц а 2 [Table 2]

**Распределение векторных фрагментов, интегрированных  
в геном трансгенных растений моркови**  
[Distribution of the vector sequences inserted into the genome of transgenic carrot plants]

Доля трансгенных растений, несущих различные фрагменты векторной ДНК, % [Fraction of transgenic plants carrying various fragments of vector DNA, %]	Фрагменты ДНК, выявленные с использованием следующих пар праймеров [DNA fragments detected using the following primer pairs]					Расположение векторных последовательностей относительно Т-ДНК [Location of vector sequences relative to T-DNA]
	BD 3/4	BD 5/6	BD 7/8	BD 9/10	BD 1/2	
5,0% (6)	+	+	+	+	+	1. Вся векторная последовательность [Entire vector sequence]
1,7% (2)	+	+	+	+		2. Векторная последовательность, прилегающая к левому повтору Т-ДНК [Vector sequence adjacent to the left border of T-DNA]
1,7% (2)	+	+	+			
5,0% (6)	+	+				
4,2% (5)	+					
Всего 12,6% (15) растений [Totally 12.6% (15) plants]						
2,5% (3)		+	+	+	+	3. Векторная последовательность, прилегающая к правому повтору Т-ДНК [Vector sequence adjacent to the right border of T-DNA]
0,8% (1)				+	+	
3,4% (4)					+	
Всего 6,7% (8) растений [Totally 6.7% (8) plants]						
0,8% (1)	+	+	+		+	4. Векторная последовательность, прилегающая к левому, и к правому повторам Т-ДНК [Vector sequences adjacent to both the left and right borders of T-DNA]
2,5% (3)	+	+			+	
1,7% (2)	+	+		+	+	
1,7% (2)	+		+	+	+	
1,7% (2)	+			+	+	
Всего 8,4% (10) растений [Totally 8.4% (10) plants]						
0,8% (1)	+	+		+		5. Векторная последовательность, прилегающая к левому повтору Т-ДНК, и векторная последовательность, интегрированная независимо от Т-ДНК [Vector sequence adjacent to the left border of T-DNA and vector fragment inserted independently]
0,8% (1)	+			+		
0,8% (1)		+				
0,8% (1)		+	+	+		
0,8% (1)		+	+	+		
Всего 3,4% (4) растений [Totally 3.4% (4) plants]						
Всего 36,1% (43) из 119 проанализированных растений [Totally 36.1% (43) of 119 plants analyzed]						

*Примечание.* В скобках указано число растений, несущих тот или иной фрагмент  
[Note. The number of plants carrying one or another fragment is given in brackets].



При тестировании анализируемых образцов с праймерами на фрагмент ДНК *A. tumefaciens* ни в одном растении не было выявлено последовательностей агробактерии (данные не представлены), что подтверждало ее отсутствие в межклетниках исследуемых растений.

В табл. 2 приведены данные распределения векторных последовательностей у 119 независимо полученных трансгенных растений моркови с праймерами BD1/2, BD3/4, BD5/6, BD7/8, BD9/10. Всего было выявлено 17 типов фрагментов векторной ДНК. Векторные последовательности были обнаружены у 43 из 119 проанализированных растений, что составило 36,1%.

По результатам нашего исследования выявлено шесть растений, несущих все исследуемые фрагменты вектора, что составило 5,0% от общего числа проанализированных растений. Полученные результаты свидетельствуют о том, что векторная последовательность перенесена в геномы трансгенных растений целиком. У других видов растений частота такого переноса варьировала – от 6,8% [5] и 8,0% [9] до 38,6% [22]. Обсуждается гипотеза [22, 23], что синтез нити Т-ДНК в некоторых случаях может не останавливаться на левом краевом повторе Т-ДНК и проскакивать через него. В результате такого проскакивания вместе с Т-ДНК реплицируется вся последовательность вектора. В случае проскакивания и правого краевого повтора вновь начинается синтез Т-ДНК, в итоге в трансгенное растение может быть интегрирована последовательность, состоящая из двух копий Т-ДНК, соединенных между собой всей векторной последовательностью [6].

Пятнадцать растений (12,6%) несли фрагмент векторной ДНК, прилежащий к левому концевому повтору Т-ДНК. Из них шесть растений (5,0%) несли фрагмент вектора средней длины  $4200 \pm 1000$  пн (пары праймеров BD3/4 и BD5/6), пять растений несли небольшой фрагмент вектора длиной 400 до 2900 пн (BD3/4). Два растения (1,7%) несли протяженный векторный фрагмент длиной  $7500 \pm 300$  пн (BD3/4, BD5/6, BD7/8, и BD9/10), а два других несли менее протяженный фрагмент векторной ДНК  $6300 \pm 500$  пн (BD3/4, BD5/6, и BD7/8).

Восемь растений (6,7%) несли фрагмент векторной ДНК, прилежащий к правому концевому повтору Т-ДНК. Из них четыре растения (3,4%) несли короткий фрагмент векторной ДНК длиной  $1000 \pm 400$  пн (выявлен только участок с парой праймеров BD1/2). Три растения (2,5%) несли длинный фрагмент  $7000 \pm 1200$  пн (BD1/2, BD9/10, BD7/8, и BD5/6), и одно растение (0,8%) несло векторный фрагмент средней длины  $2300 \pm 500$  пн (BD1/2 и BD9/10).

Векторные последовательности, прилежащие как к левому, так и к правому концевому повтору Т-ДНК, были выявлены у десяти растений (8,4%) в пяти различных вариантах. У трех растений (2,5%) выявлен фрагмент, прилежащий к левому повтору длиной  $4200 \pm 1000$  пн (BD3/4 и BD5/6), и еще небольшой  $1000 \pm 400$  пн (BD1/2) фрагмент векторной ДНК, прилежащий к правому повтору Т-ДНК. Два растения (1,7%) несли два фрагмента вектор-

ной ДНК, один из которых, имеющий длину  $4200 \pm 1000$  пн (BD3/4 и BD5/6), прилежал к левому повтору Т-ДНК, а второй, длиной  $2300 \pm 500$  пн (BD1/2 и BD9/10), прилежал к правому повтору. Два растения (1,7%) несли два фрагмента векторной ДНК – один прилежал к левому повтору Т-ДНК длиной  $1650 \pm 1250$  пн (BD3/4), другой, длиной  $4300 \pm 1000$  пн (BD1/2, BD9/10, и BD7/8), прилежал к правому повтору Т-ДНК. Еще два (1,7%) растения несли сравнительно небольшие фрагменты векторной ДНК – прилежащий к левому повтору Т-ДНК длиной  $1650 \pm 1250$  пн (BD3/4) и прилежащий к правому повтору Т-ДНК длиной  $2300 \pm 500$  пн (BD1/2 и BD9/10). Одно растение (0,8%) несло два векторных фрагмента – протяженный фрагмент векторной ДНК, прилежащий к левому повтору, длиной  $6300 \pm 500$  пн (BD3/4, BD5/6, и BD7/8), и небольшой фрагмент длиной  $1000 \pm 400$  пн (BD1/2), прилежащий к правому повтору.

Наши данные подтверждают гипотезу, согласно которой при переносе всей векторной последовательности в геном растения происходит ошибка считывания левого концевого повтора – потому что векторных фрагментов, прилежащих к левому повтору, практически в два раза больше (22,7%), чем векторных фрагментов, прилежащих к правому повтору (15,1%). Более того, среди растений, содержащих векторную последовательность, прилежащую к левому концевому повтору, выше разнообразие схем встраивания, чем у растений, содержащих векторную последовательность, прилежащую к правому концевому повтору. Таким образом, мы считаем, что растения, несущие фрагменты вектора, прилежащие к левому концевому, как и растения, несущие все пять векторных фрагментов, образуются в результате ошибок определения левого концевого повтора при процессинге Т-ДНК. Полученные нами данные подтверждают гипотезу о том, что точность надреза в области правого концевого повтора является важным этапом процессинга Т-ДНК [9, 11, 24].

На сегодняшний день разработан ряд методов (введение селективных генов в векторную ДНК, создание специальных систем рекомбинации) [26], позволяющих выявлять и элиминировать растения, несущие фрагменты векторной ДНК. Встраивание гена, летального для растений, в область за границей Т-ДНК также позволяет элиминировать векторные последовательности, однако при трансформации растений подобной конструкцией падает частота трансформации [27]. Также существует метод конструирования, направленный на понижение частоты переноса векторных последовательностей в геном растений. Две или три копии последовательности левого краевого повтора встраиваются в плазмиду непосредственно рядом с исходным левым повтором. Таким образом, частота правильного определения левого повтора значительно возрастает, и Т-ДНК в большинстве случаев вырезается правильно [24]. Как можно заметить, большая часть этих методов направлена на выявление и элиминацию растений, несущих векторные последовательности, прилежащие к концевым векторным повторам. В связи с этим

особый интерес представляют растения, несущие фрагменты векторной ДНК, не сцепленные с Т-ДНК.

По результатам нашего исследования было выявлено 4 таких растения, что составило 3,4% от общего числа проанализированных растений. Среди них было выявлено 2 растения (1,6%), содержащих кроме последовательности вектора, встроившейся независимо от Т-ДНК, длиной  $1300 \pm 900$  пн (BD9/10), еще и фрагмент векторной последовательности, прилежащий к левому повтору, длиной  $4200 \pm 1000$  пн (BD3/4 и BD5/6) или  $1\,650 \pm 1\,250$  пн (BD3/4). Появление подобных растений могло быть связано с тем, что в процессе репарации участок встроившейся векторной ДНК был заменен на растительную ДНК, или небольшой фрагмент векторной ДНК встроился в растительную ДНК независимо от Т-ДНК. Также нами было выявлено два растения (1,6%), содержащих только один фрагмент векторной ДНК, встроившийся независимо от Т-ДНК, – длинный  $5\,900 \pm 1\,600$  пн (BD5/6, BD7/8, и BD9/10) и короткий  $2\,550 \pm 200$  пн (BD5/6). Предполагаемый механизм образования подобных конструкций следующий: при процессинге Т-ДНК белок VirD2 после разрезания нити ДНК тесно связан не только с 5' концом Т-нити, но и с 5' концом не-Т-ДНК-овой части. Таким образом, белок VirD2 может инициировать перенос векторной части плазмиды так же, как и Т-ДНК [9].

Можно предположить, что частота переноса векторных фрагментов, независимых от Т-ДНК, при агробактериальной трансформации может быть еще выше. Так как часть трансформированных растений может нести только фрагмент вектора и не нести Т-ДНК, то при селективном отборе эти растения будут элиминированы. Для идентификации в растительном геноме фрагментов векторной ДНК, встроившихся независимо от Т-ДНК, необходимо создание новых векторов с дополнительными маркерами векторных фрагментов.

Встроившиеся в растительный геном участки векторной ДНК, окружающие Т-ДНК, были клонированы и просеквенированы у двух растений моркови (№33/2 и №106). Поиск гомологичных последовательностей в базе данных GenBank подтвердил их происхождение из плазмиды pBI121, которую использовали для получения исследуемых трансгенных растений. Выравнивание различных вариантов последовательности, прилежащей к левому концевому повтору, для растения 106 показало, что все они имеют сходство между собой и, по-видимому, относятся к одной копии Т-ДНК. Встраивание таких фрагментов в растительный геном представляется крайне нежелательным событием, особенно принимая во внимание то, что Т-ДНК встраивается преимущественно в транскрипционно активные районы генома [12, 27], что делает теоретически возможным встраивание плазмидного гена под растительный промотор и последующую его экспрессию.

Присутствие векторных последовательностей затрудняет исследование прилежащих к Т-ДНК участков растительной ДНК и выявление рас-

тительных генов, функция которых была нарушена в результате встройки чужеродной инсерции. С точки зрения биобезопасности и коммерческого использования трансгенные растения не должны содержать генов устойчивости к антибиотикам и других «посторонних» фрагментов ДНК. В то же время перенос векторных последовательностей, по-видимому, является частью механизма переноса Т-ДНК, что необходимо принимать во внимание при получении трансгенных растений.

### Заключение

Проведенное нами исследование показывает, что при агробактериальной трансформации в ядерный геном трансгенных растений моркови с частотой 36,1% переносятся и стабильно интегрируются векторные последовательности, которые имеют сложную структуру и несут в себе различные плазмидные гены. Показано, что обе границы Т-ДНК могут определяться и вырезаться неправильно, что приводит к образованию растений, несущих Т-ДНК, с обеих сторон окруженную векторными последовательностями. Показано, что в одно и то же растение, кроме Т-ДНК, вырезанной с ошибкой, может встраиваться и последовательность вектора, не зависящая от Т-ДНК. Встраивание векторных последовательностей подтверждено секвенированием.

### Литература

1. Tzfira T., Citovsky V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology // Curr. Opin. Biotechnol. 2006. Vol. 17, № 2. P. 147–154.
2. Stachel S.E., Timmerman B., Zambryski P. Activation of *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: requirement for 5' virD gene products // EMBO J. 1987. Vol. 6, № 4. P. 857–863.
3. Martineau B., Voelker T.A., Sanders R.A. On Defining T-DNA // Plant Cell. 1994. Vol. 6, № 8. P. 1032–1033.
4. Ramanathan V., Veluthambi K. Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA // Plant Mol. Biol. 1995. Vol. 28, № 6. P. 1149–1154.
5. Van der Graaff E., den Dulk-Ras A., Hooykaas P.J. Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants // Plant Mol. Biol. 1996. Vol. 31, № 3. P. 677–681.
6. Wenck A., Czako M., Kanevski I., Márton L. Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation // Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 34, № 6. P. 913–922.
7. Kononov M.E., Bassuner B., Gelvin S.B. Integration of T-DNA binary vector “backbone” sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration // Plant J. 1997. Vol. 11, № 5. P. 945–957.
8. Jakowitsch J., Papp I., Moscone E.A., van der Winden J., Matzke M., Matzke A.J.M. Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans // Plant J. 1999. Vol. 17, № 2. P. 131–140.
9. De Buck S., de Wilde C., van Montagu M., Depicker A. T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium* -mediated transformation // Mol. Breed. 2000. Vol. 6. P. 459–468.

10. Yin Z., Wang G.-L. Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome // *Theor. Appl. Genet.* 2000. Vol. 100, № 3–4. P. 461–470.
11. Meza T.J., Stangeland B., Mercy I.S., Skärn M., Nymoen D.A., Berg A., Butenko M.A., Håkelién A.-M., Haslekås C., Meza-Zepeda L.A., Aalen R.B. Analyses of single-copy *Arabidopsis* T-DNA-transformed lines show that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgene silencing // *Nucleic Acids Res.* 2002. Vol. 30, № 20. P. 4556–4566.
12. Iglesias V.A., Moscone E.A., Papp I., Neuhuber F., Michalowski S., Phelan T., Spiker S., Matzke M., Matzke A.J.M. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco // *Plant Cell.* 1997. Vol. 9, № 8. P. 1251–1264.
13. Müller A.E., Kamisugi Y., Grüneberg R., Niedenhof I., Hörold R.J., Meyer P. Palindromic sequences and A+T-rich DNA elements promote illegitimate recombination in *Nicotiana tabacum* // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 291, № 1. P. 29–46.
14. Linden R.M., Ward P., Giraud C., Winocour E., Berns K.I. Site-specific integration by adeno-associated virus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93, № 21. P. 11288–11294.
15. Paul M., Ma J.K.-C. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2011. Vol. 58, № 1. P. 58–67.
16. Guan Z., Guo B., Huo Y., Guan Z., Dai J., Wei Y. Recent advances and safety issues of transgenic plant-derived vaccines // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97, № 7. P. 2817–2840.
17. Uvarova E.A., Belavin P.A., Permyakova N.V., Zagorskaya A.A., Nosareva O.V., Kakimzhanova A.A., Deineko E.V. Oral immunogenicity of plant-made *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10 // *Biomed Res. Int.* 2013. P. 316304.
18. Yakushenko E., Lopatnikova J., Khrapov E., Deineko E., Filipenko M., Voronina E., Turchinovich A., Filipenko E., Pukhnatcheva N., Tukavin G., Schmikova N., Shumny V., Sennikov S., Kozlov V. Use of transgenic carrot plants producing human interleukin-18 for modulation of mouse immune response // *New Research on Biotechnology in Biology and Medicine* /ed. by A.M. Egorov и G. Zaikov. New York, USA : Nova Science Publishers, 2006. P. 97–107.
19. Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Поздняков С.Г., Филипенко Е.А., Пермякова Н.В., Сидорчук Ю.В., Уварова Е.А., Позднякова Л.Д., Шумный В.К., Власов В.В., Хэммонд Р.В., Щелкунов С.Н. Анализ продукции М-антигена вируса гепатита В в листьях трансгенных растений моркови // *Доклады Академии наук.* 2009. № 3. С. 76–79.
20. Draper J., Scott R., Armitidge F. Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual. Boston : Blackwell Scientific Publications, 1988. 355 p.
21. Ochman H., Ajioka J.W., Garza D., Hartl D.L. Inverse polymerase chain reaction // *BioTechnology.* 1990. Vol. 8, № 8. P. 759–760.
22. Kim S.-R., Lee J., Jun S.-H., Park S., Kang H.-G., Kwon S., An G. Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants // *Plant Mol. Biol.* 2003. Vol. 52, № 4. P. 761–773.
23. Lamphear B.J., Barker D.K., Brooks C.A., Delaney D.E., Lane J.R., Beifuss K., Love R., Thompson K., Mayor J., Clough R., Harkey R., Poage M., Drees C., Horn M.E., Streatfield S.J., Nikolov Z., Woodard S.L., Hood E.E., Jilka J.M., Howard J.A. Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener // *Plant Biotechnol. J.* 2005. Vol. 3, № 1. P. 103–114.
24. Kuraya Y., Ohta S., Fukuda M., Hiei Y., Murai N., Hamada K., Ueki J., Imaseki H., Komari T. Suppression of transfer of non-T-DNA vector backbone sequences by multiple left border repeats in vectors for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Mol. Breed.* 2004. Vol. 14, № 3. P. 309–320.
25. Podevin N., De Buck S., De Wilde C., Depicker A. Insights into recognition of the T-DNA border repeats as termination sites for T-strand synthesis by *Agrobacterium tumefaciens* // *Transgenic Res.* 2006. Vol. 15, № 5. P. 557–571.

26. Kondrák M., van der Meer I.M., Bánfalvi Z. Generation of marker- and backbone-free transgenic potatoes by site-specific recombination and a bi-functional marker gene in a non-regular one-border *agrobacterium* transformation vector // *Transgenic Res.* 2006. Vol. 15, № 6. P. 729–737.
27. Hanson B., Engler D., Moy Y., Newman B., Ralston E., Gutterson N. A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences // *Plant J.* 1999. Vol. 19, № 6. P. 727–734.
28. Zhang J., Guo D., Chang Y., You C., Li X., Dai X., Weng Q., Zhang J., Chen G., Li X., Liu H., Han B., Zhang Q., Wu C. Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13 804 T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library // *Plant J.* 2007. Vol. 49, № 5. P. 947–959.

Поступила в редакцию 15.07.2015 г.; повторно 05.10.2015 г.; принята 15.10.2015 г.

#### Авторский коллектив:

**Пермякова Наталья Владиславовна** – канд. биол. наук, м.н.с. лаборатории биоинженерии растений Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия).

E-mail: [puh@bionet.nsc.ru](mailto:puh@bionet.nsc.ru)

**Дейнеко Елена Викторовна** – профессор, д-р биол. наук, зав. лабораторией биоинженерии растений Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия); профессор кафедры физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета (г. Томск, Россия).

E-mail: [deineko@bionet.nsc.ru](mailto:deineko@bionet.nsc.ru)

Permyakova NV, Deineko EV. Vector DNA fragments integrating into transgenic carrot genome during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology.* 2015;4(32):145-161. doi: 10.17223/19988591/32/8. In Russian, English summary

**Natalya V. Permyakova<sup>1</sup>, Elena V. Deineko<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

<sup>2</sup> *Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation*

### Vector DNA fragments integrating into transgenic carrot genome during *Agrobacterium*-mediated transformation

Insertion of foreign genes into plants using T-DNA is one of the major techniques for creating stable strains of transgenic plants. This technique, however, is prone to errors, in which vector backbone sequences are also inserted into the plant genome. In present work we assess the rate and diversity of such undesirable vector insertion using sampling of transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants. We have demonstrated that various fragments of vector DNA are transferred to the genome of transgenic carrot plants due to the errors in T-DNA processing. Totally, 17 types of vector DNA fragments were detected. We found vector sequences in 43 of the 119 analyzed plants (36.1%). The fragments can either be very small (300-400 bp) or contain the entire vector sequence (8600 bp in the case of plasmid pBi121). We have also demonstrated that both T-DNA borders can be erroneously determined and cut. Our data confirm the hypothesis that the error in identification of the left terminal repeat occurs during transfer of the entire vector sequence into the plant genome, as the number of the vector sequences adjacent to the left terminal repeat (22.7% 27 plants carrying such fragments) exceeds the number



of those adjacent to the right terminal repeat (15.1% 18 plants carrying such fragments). Our data comply with the published data, stating that a precise cut in the region of the right terminal repeat is an important stage in T-DNA processing. Our work also showed that a vector sequence can be inserted independently of T-DNA into the same plant that carries an incorrectly excised T-DNA. We have found four plants (3.4%) which carry vector fragments that were inserted independently of T-DNA. Presumably, the transfer rate of the vector fragments independently of T-DNA during *Agrobacterium*-mediated transformation can be even higher. Some part of the transformed plants may contain only a vector fragment and lack T-DNA, such plants will be eliminated during selection. The regions of vector DNA from two carrot plants inserted adjacent to T-DNA into the genome of two carrot plants were cloned and sequenced. The search for homologous sequences in GenBank confirmed that they originated from the plasmid pBI121, used for producing these transgenic plants. Thus, the transfer of vector sequences that is an undesirable, but apparently at present unavoidable part of the mechanism of T-DNA transfer, should be kept in mind when producing transgenic plants.

**Acknowledgments:** This work was partially supported by ICiG SB RAS budget Project "Fundamental bases of biotechnology creating therapies and diagnosis of diseases", VI.62.1.5.

*The article contains 2 Figures, 2 Tables, 28 References.*

**Key words:** transgenic plants; vector backbone sequences; T-DNA integration; *Agrobacterium tumefaciens*.

### References

1. Tzfira T, Citovsky V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2006;17(2):147-154. doi: [10.1016/j.copbio.2006.01.009](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.01.009)
2. Stachel SE, Timmerman B, Zambryski P. Activation of *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: requirement for 5' virD gene products. *EMBO J.* 1987;6(4):857-863
3. Martineau B, Voelker TA, Sanders RA. On Defining T-DNA. *Plant Cell.* 1994;6(8):1032-1033. doi: [10.1105/tpc.6.8.1032](https://doi.org/10.1105/tpc.6.8.1032)
4. Ramanathan V, Veluthambi K. Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Mol. Biol.* 1995;28(6):1149-1154. doi: [10.1007/BF00032676](https://doi.org/10.1007/BF00032676)
5. Van der Graaff E, den Dulk-Ras A, Hooykaas PJ. Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. *Plant Mol. Biol.* 1996;31(3):677-681. doi: [10.1007/BF00042239](https://doi.org/10.1007/BF00042239)
6. Wenck A, Czakó M, Kanevski I, Márton L. Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 1997;34(6):913-922. doi: [10.1023/A:1005849303333](https://doi.org/10.1023/A:1005849303333)
7. Kononov ME, Bassuner B, Gelvin SB. Integration of T-DNA binary vector "backbone" sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J.* 1997;11(5):945-957. doi: [10.1046/j.1365-313X.1997.11050945.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11050945.x)
8. Jakowitsch J, Papp I, Moscone EA, van der Winden J, Matzke M, Matzke AJM. Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant J.* 1999;17(2):131-140. doi: [10.1046/j.1365-313X.1999.00357.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00357.x)
9. De Buck S, de Wilde C, van Montagu M, Depicker A. T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium* - mediated transformation. *Mol. Breed.* 2000;6:459-468. doi: [10.1023/A:1026575524345](https://doi.org/10.1023/A:1026575524345)



10. Yin Z, Wang G-L. Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome. *TAG Theor. Appl. Genet.* 2000;100(3-4):461-470. doi: [10.1007/s001220050060](https://doi.org/10.1007/s001220050060)
11. Meza TJ, Stangeland B, Mercy IS, Skårn M, Nymoen DA, Berg A, Butenko MA, Håkelién A-M, Haslekås C, Meza-Zepeda LA, Aalen RB. Analyses of single-copy *Arabidopsis* T-DNA-transformed lines show that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgene silencing. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(20):4556-4566. doi: [10.1093/nar/gkf568](https://doi.org/10.1093/nar/gkf568)
12. Iglesias VA, Moscone EA, Papp I, Neuhauser F, Michalowski S, Phelan T, Spiker S, Matzke M, Matzke AJM. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell.* 1997;9(8):1251-1264. doi: [10.1105/tpc.9.8.1251](https://doi.org/10.1105/tpc.9.8.1251)
13. Müller AE, Kamisugi Y, Grüneberg R, Niedenhof I, Hörold RJ, Meyer P. Palindromic sequences and A+T-rich DNA elements promote illegitimate recombination in *Nicotiana tabacum*. *J. Mol. Biol.* 1999;291(1):29-46. doi: [10.1006/jmbi.1999.2957](https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2957)
14. Linden RM, Ward P, Giraud C, Winocour E, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93(21):11288-11294.
15. Paul M, Ma JK-C. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2011;58(1):58-67. doi: [10.1002/bab.6](https://doi.org/10.1002/bab.6)
16. Guan Z, Guo B, Huo Y, Guan Z, Dai J, Wei Y. Recent advances and safety issues of transgenic plant-derived vaccines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013;97(7):2817-40. doi: [10.1007/s00253-012-4566-2](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4566-2)
17. Uvarova EA, Belavin PA, Permyakova NV, Zagorskaya AA, Nosareva OV, Kakimzhanova AA, Deineko EV. Oral immunogenicity of plant-made *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10. *Biomed Res. Int.* 2013;2013:316304. doi: [10.1155/2013/316304](https://doi.org/10.1155/2013/316304)
18. Yakushenko E, Lopatnikova J, Khrapov E, Deineko E, Filipenko M, Voronina E, Turchinovich A, Filipenko E, Pukhnatcheva N, Tukavin G, Schmikova N, Shumny V, Sennikov S, Kozlov V. Use of transgenic carrot plants producing human interleukin-18 for modulation of mouse immune response. In: *New Research on Biotechnology in Biology and Medicine*. Egorov AM, Zaikov G, editors. New York, USA: Nova Science Publ.; 2006. pp. 97-107.
19. Deineko EV, Zagorskaya AA, Pozdnyakov SG, Filipenko EA, Permyakova NV, Sidorchuk YV, Uvarova, EA, Pozdnyakova LD, Shumny VK, Vlasov VV, Hammond RV, Shchelkunov SN. Comparative analysis of HBV M-antigen production in leaves of individual transgenic carrot plants. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2009;425(1):76-79. doi: [10.1134/S1607672909020057](https://doi.org/10.1134/S1607672909020057)
20. Draper J, Scott R, Armitidge F, Walden R. Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual. Oxford: Blackwell; 1988. 355 p.
21. Ochman H, Ajioka JW, Garza D, Hartl DL. Inverse polymerase chain reaction. *Bio/Technology.* 1990;8(8):759-760. doi: [10.1038/nbt0890-759](https://doi.org/10.1038/nbt0890-759)
22. Kim S-R, Lee J, Jun S-H, Park S, Kang H-G, Kwon S, An G. Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol. Biol.* 2003;52(4):761-773. doi: [10.1023/A:1025093101021](https://doi.org/10.1023/A:1025093101021)
23. Lamphear BJ, Barker DK, Brooks CA, Delaney DE, Lane JR, Beifuss K, Love R, Thompson K, Mayor J, Clough R, Harkey R, Poage M, Drees C, Horn ME, Streatfield SJ, Nikolov Z, Woodward SL, Hood EE, Jilka JM, Howard JA. Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener. *Plant Biotechnol. J.* 2005;3(1):103-114. doi: [10.1111/j.1467-7652.2004.00105.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00105.x)
24. Kuraya Y, Ohta S, Fukuda M, Hiei Y, Murai N, Hamada K, Ueki J, Imaseki H, Komari T. Suppression of transfer of non-T-DNA vector backbone sequences by multiple left border repeats in vectors for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Breed.* 2004;14(3):309-320. doi: [10.1023/B:MOLB.0000047792.77219.bb](https://doi.org/10.1023/B:MOLB.0000047792.77219.bb)
25. Podevin N, De Buck S, De Wilde C, Depicker A. Insights into recognition of the T-DNA border repeats as termination sites for T-strand synthesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res.* 2006;15(5):557-71. doi: [10.1007/s11248-006-9003-9](https://doi.org/10.1007/s11248-006-9003-9)

26. Kondrák M, van der Meer IM, Bánfalvi Z. Generation of marker- and backbone-free transgenic potatoes by site-specific recombination and a bi-functional marker gene in a non-regular one-border agrobacterium transformation vector. *Transgenic Res.* 2006;15(6):729-37. doi: [10.1007/s11248-006-9021-7](https://doi.org/10.1007/s11248-006-9021-7)
27. Hanson B, Engler D, Moy Y, Newman B, Ralston E, Gutterson N. A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J.* 1999;19(6):727-34. doi: [10.1046/j.1365-313x.1999.00564.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00564.x)
28. Zhang J, Guo D, Chang Y, You C, Li X, Dai X, Weng Q, Zhang J, Chen G, Li X, Liu H, Han B, Zhang Q, Wu C. Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13 804 T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library. *Plant J.* 2007;49(5):947-59. doi: [10.1111/j.1365-313X.2006.03001.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.03001.x)

Received July 15, 2015;

Revised October 10, 2015;

Accepted October 15, 2015

#### Author info:

**Permyakova Natalya V**, Cand. Sci. (Biol.), Junior Researcher, Laboratory of Plant Bioengineering, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

E-mail: [puh@bionet.nsc.ru](mailto:puh@bionet.nsc.ru)

**Deineko Elena V**, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Plant Bioengineering, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentieva Pr., Novosibirsk 630090, Russian Federation; Professor, Department of Plant Physiology & Biotechnology, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Pr., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: [deineko@bionet.nsc.ru](mailto:deineko@bionet.nsc.ru)