

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc635661>

Применение полуколичественной петлевой изотермической амплификации для оценки уровня экспрессии генов в культуре клеток Hcr1293

П.А. Бобровский^{1,2}, Е.Н. Графская¹, Д.Д. Харлампиева¹, Г.Ю. Фисунов³, В.А. Манувера^{1,2}, В.Н. Лазарев^{1,2}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;

³ Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Клеточные культуры млекопитающих играют ключевую роль в фармакологической промышленности, требуя постоянного мониторинга состояния во время ферментации. Помимо контроля физико-химических параметров важно оценивать состояние клеток, для чего используется анализ экспрессии генов. В настоящее время доминирующим методом служит количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР) с обратной транскрипцией. Однако метод петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) также привлекает внимание благодаря своей высокой специфичности, чувствительности и скорости проведения реакции. LAMP становится перспективным инструментом для быстрого анализа экспрессии генов, особенно в условиях ограниченного количества биологического материала или большого объема проб.

Цель исследования — разработка методики полуколичественной оценки уровня экспрессии целевых генов в культуре клеток человека Hcr1293 с помощью LAMP.

Материалы и методы. Для проведения LAMP был получен рекомбинантный большой фрагмент ДНК-полимеразы *Bacillus stearothermophilus* (Bst-pol), выполнена его очистка и определены оптимальные условия реакции. В качестве интеркалирующих красителей использовали SYBR Green I и LUCS13. Проанализированы параметры амплификации для различных концентраций фермента и красителя. Для кПЦР использовали стандартные наборы с SYBR Green I. Обе методики сравнивали в процессе анализа экспрессии генов *IGF1*, *FGF2* и *EIF3i* в клеточных линиях с повышенным уровнем экспрессии этих генов.

Результаты. Показано, что использование красителя LUCS13 обеспечивает классическую S-образную форму кривой накопления сигнала в LAMP, в то время как использование SYBR Green I приводит к её искажению (вызывает артефакты). Оптимальной признана концентрация Bst-pol 40 нг/мкл. При сравнении двух методов установлено, что LAMP обладает большей чувствительностью, позволяет определять экспрессию генов с точностью, сравнимой с кПЦР, демонстрируя более короткое время реакции (до 35 мин).

Заключение. Хотя кПЦР остаётся основным методом оценки уровня экспрессии генов, LAMP предлагает ряд преимуществ, которые делают её привлекательной альтернативой для различных биотехнологических целей. Благодаря высокой скорости, простоте выполнения и доступности, а также высокой чувствительности и специфичности LAMP является ценным инструментом для быстрого анализа экспрессии генов в ходе мониторинга клеточных культур.

Ключевые слова: количественная ПЦР; ДНК-полимераза I; рекомбинантный белок; петлевая изотермическая амплификация; экспрессия генов.

Как цитировать:

Бобровский П.А., Графская Е.Н., Харлампиева Д.Д., Фисунов Г.Ю., Манувера В.А., Лазарев В.Н. Применение полуколичественной петлевой изотермической амплификации для оценки уровня экспрессии генов в культуре клеток Hcr1293 // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 4. С. 425–440. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc635661>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc635661>

Application of semi-quantitative loop-mediated isothermal amplification for gene expression study in Expi293 cells

Pavel A. Bobrovsky^{1,2}, Ekaterina N. Grafkskaia¹, Daria D. Kharlampieva¹, Gleb Yu. Fisunov³, Valentin A. Manuvera^{1,2}, Vassili N. Lazarev^{1,2}

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia;

² Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia;

³ Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Mammalian cell cultures play a key role in the pharmaceutical industry, requiring constant monitoring of the cell conditions during fermentation. In addition to monitoring of the physical-chemical parameters, it is important to evaluate the transcription state of cells, for which gene expression analysis is used. Currently, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qPCR) is the dominant method. However, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique also attracts attention due to its high specificity, sensitivity and reaction rate. LAMP is becoming a promising tool for rapid analysis of gene expression, especially under the conditions of limited biological material or a large volume of samples.

AIM: Development of a technique for semi-quantifying the expression level of target genes in human cell culture Expi293 using LAMP.

MATERIALS AND METHODS: For LAMP, a recombinant large fragment of *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase (Bst-pol) was obtained, purified, and optimal reaction conditions were determined. SYBR Green I and LUCS13 were used as intercalating dyes. The amplification parameters for different concentrations of the enzyme and the dye were analyzed. Standard SYBR Green I kits were used for qPCR. Both methods were compared when analyzing the expression of *IGF1*, *FGF2* and *EIF3i* genes in cell lines with an increased expression level of these genes.

RESULTS: It has been shown that using LUCS13 dye provides the classic S-shape of the signal accumulation curve in LAMP, while using SYBR Green I dye causes artifacts. The optimal concentration of Bst-pol was 40 ng/μl. When comparing the two methods, it was found that LAMP has greater sensitivity, allows determining gene expression with an accuracy comparable to qPCR, demonstrating a shorter reaction time (up to 35 minutes).

CONCLUSION: Although qPCR remains the main method for assessing the level of gene expression, LAMP offers a number of advantages that make it an attractive alternative for various biotechnological purposes. Due to its high speed, ease of execution and accessibility, as well as high sensitivity and specificity, LAMP is a valuable technique for rapid analysis of gene expression during cell culture monitoring.

Keywords: real-time polymerase chain reaction; DNA polymerase I; recombinant proteins; loop-mediated isothermal amplification; gene expression.

To cite this article:

Bobrovsky PA, Grafkskaia EN, Kharlampieva DD, Fisunov GYu, Manuvera VA, Lazarev VN. Application of semi-quantitative loop-mediated isothermal amplification for gene expression study in Expi293 cells. *Genes & cells*. 2024;19(4):425–440. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc635661>

ВВЕДЕНИЕ

Культуры клеток млекопитающих используются в целом ряде важнейших производственных процессов в современной фармакологической промышленности: в процессе изготовления продукции рекомбинантных белков [1], вакцин [2] и векторов для генной терапии [3]. Ферментация клеточных культур требует постоянного оперативного контроля их состояния. Помимо физико-химических параметров, таких как температура, pH, парциальных давлений кислорода и углекислого газа, концентрации питательных веществ, важно знать и транскрипционный профиль клеток. Регуляция экспрессии генов служит глобальным способом ответа клеток на изменение условий. Каждая культура экспрессирует как гены домашнего хозяйства, так и специфичные именно для неё гены. Экспрессия генов домашнего хозяйства может говорить об общем статусе клеточной культуры, а специфичных генов — об её соответствии технологическим условиям производства. Для анализа уровня экспрессии определённых генов используют различные методы количественной амплификации нуклеиновых кислот. Доминирующее положение среди них занимает количественная цепная полимеразная реакция (кПЦР) с обратной транскрипцией. Однако развитие методов аналитической амплификации продолжается.

Относительно недавно был разработан метод петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [4], который получил широкое распространение в ходе пандемии COVID-19 [5–7]. LAMP позволяет проводить амплификацию целевой ДНК-последовательности при постоянной температуре и отличается высокой специфичностью и чувствительностью, что делает его идеальным для быстрой и точной диагностики различных инфекционных заболеваний [8]. Ключевым ферментом, используемым в методе LAMP, является ДНК-полимераза с активностью смещения цепи. Этот фермент не только синтезирует новые цепи ДНК, но и эффективно вытесняет уже существующие цепи, что позволяет амплификации происходить непрерывно без необходимости циклического нагрева и охлаждения. Чаще всего в LAMP используется фермент Bst-полимераза (из бактерии *Bacillus stearothermophilus*), который обладает высокой термостабильностью и активностью при постоянной температуре (обычно 60–65 °С). Такой критерий, как широкий диапазон детектируемых концентраций ДНК, даёт серьёзное преимущество именно при работе с биоптатами тканей, мазками и другими образцами, содержащими малое количество биологического материала. В исследовательских работах чаще всего ограничения на биологический материал не столь существенны. Однако при работе с медленно растущими культурами, когда требуется продолжительное время для получения достаточного количества биоматериала, а также при анализе большого количества клонов клеток, полученных, например, в ходе

геномного редактирования, перспективным вариантом быстрого анализа экспрессии генов представляется LAMP. Современные варианты LAMP адаптированы для быстрого анализа образцов с минимальной пробоподготовкой: варианты RT-LAMP (с обратной транскрипцией, reverse transcription) [9], а также варианты с интеркалирующими красителями или зондами для количественной оценки — qLAMP (количественная, quantitative LAMP) [10], dLAMP (цифровая, digital LAMP) [11, 12]. В реакции LAMP используется шесть праймеров, которые распознают шесть разных участков целевой последовательности. Это значительно увеличивает специфичность метода по сравнению с традиционными, такими как ПЦР, где обычно применяются два праймера. В контексте экспрессии генов это позволяет точнее и более надёжно детектировать даже малые уровни экспрессии целевого гена, избегая ложноположительных результатов.

В представленной работе мы применили метод LAMP для полуколичественной оценки уровня экспрессии генов в трёх трансгенных линиях клеток Expi293 с повышенным уровнем экспрессии одного из эндогенных факторов пролиферации — IGF1, FGF2 или EIF3i [13]. Для этого мы получили рекомбинантный большой фрагмент ДНК-полимеразы *Bacillus stearothermophilus* (Bst-pol) [4], подобрали условия проведения LAMP и сравнили полученные результаты с результатами кПЦР. В нашей работе показаны высокий уровень корреляции между полученными данными для двух этих методов и, следовательно, принципиальная возможность применения LAMP для быстрого анализа большого количества культур на наличие или отсутствие экспрессии целевых генов.

Цель исследования — разработка методики полуколичественной оценки уровня экспрессии целевых генов в культуре клеток человека Expi293 с использованием метода LAMP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии клеток

В работе использовали клеточные линии Expi293F (Gibco, США), а также модифицированные клеточные линии с активированной экспрессией одного из генов ростовых факторов: Expi293-IGF1, Expi293-FGF2, Expi293-EIF3i [13].

Получение рекомбинантной Bst-полимеразы I

Фрагмент ДНК, кодирующий участок ДНК-полимеразы (Bst-pol) бактерии *Geobacillus stearothermophilus* [14] (другое название — *Bacillus stearothermophilus*) без N-концевого экзонуклеазного домена, синтезирован *in vitro* из олигодезоксирибонуклеотидов. Полученный фрагмент ДНК был использован для конструирования экспрессионного вектора на основе плазмиды pET-22b (Novagen, США). В результате получена плазида pET-BstPoll-NHis, в которой экспрессия рекомбинантного гена

находится под контролем промотора бактериофага T7, а кодируемый белок имеет N-концевой гексагистидиновый мотив (приложение 1).

Для получения рекомбинантной Bst-pol клетки *Escherichia coli* штамма BL21-gold (DE3) трансформировали плазмидой pET-BstPoll-NHis. Единичной колонией заседали среду LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 150 мкг/мл ампициллина) и культивировали в течение ночи при 30 °C в шейкере-инкубаторе. Полученную биомассу в объёме 100 мл вносили в био-реактор Minifors-2 (Infors HT, Швейцария), заполненный двукратной средой LB (2% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 1% NaCl). Ферментацию проводили при температуре 30 °C. Уровень растворённого кислорода составлял 30%, контроль осуществлялся оборотами импеллера (300–800 об./мин) и подачей воздуха (0,3–1,5 л/мин), pH поддерживали на уровне 7,1. Индукцию экспрессии рекомбинантного гена проводили путём добавления изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид до концентрации 1 mM по достижении культурой оптической плотности — OP_{600} 2,0. После внесения индуктора культивирование продолжали в течение 4 ч.

Клетки *E. coli* центрифугировали при 2500 g в течение 15 мин. Затем их промывали физиологическим раствором и снова центрифугировали. После этого клетки ресуспендировали в дистиллированной воде. Охлаждённые клетки разрушали с использованием ультразвукового дегрегатора Branson 250 Sonifier (Branson, США) при 50% максимальной мощности в течение 10 мин. Лизат центрифугировали при 15 000 g в течение 15 мин. Далее к супернатанту добавляли хроматографический буфер (конечная концентрация: 500 mM NaCl, 20 mM NaH_2PO_4 , 10 mM имидазола, pH 7,4), после чего проводили центрифугирование при 15 000 g в течение 15 мин. Супернатант наносили на хроматографическую колонку, содержащую сорбент Ni Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, США), предварительно уравновешенный хроматографическим буфером. После нанесения колонку промывали буферным раствором (500 mM NaCl, 20 mM NaH_2PO_4 , 40 mM имидазола, pH 7,4), после чего проводили элюцию с использованием элюирующего буфера (500 mM NaCl, 20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM имидазола, pH 7,4). Скорость потока составляла 1,5 мл/мин. Контроль процесса и сбор фракций проводили путём измерения абсорбции элюата при 280 нм. Дополнительную очистку выделенного белка осуществляли, используя ионообменную хроматографию с элюцией линейным градиентом концентрации хлорида натрия. Для этого образец, содержащий целевой рекомбинантный белок, разводили в десять раз раствором 20 mM ТрисCl (pH 7,0) и наносили на колонку, заполненную Q-Sepharose (GE Healthcare, США). Элюцию выполняли линейным градиентом от 20 mM ТрисCl (pH 7,0) до 20 mM ТрисCl, 500 mM NaCl (pH 7,0). К выделенному рекомбинантному белку добавляли дитиотреитол до 2 mM, ЭДТА до 0,2 mM, тритон X-100 до 0,2%, глицерин до 50% и хранили при –20 °C.

Выделение РНК и обратная транскрипция

Клетки линии Epr1293, в том числе модифицированные, культивировали в 12-луночных планшетах (Corning, США) в среде DMEM (HiMedia, Индия), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Gibco, США), 1,5 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) при 37 °C в CO_2 -инкубаторе (Heraeus, Германия), при относительной влажности $\geq 80\%$ и 5% CO_2 . Для выделения суммарной РНК использовали реагент ExtractRNA («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Количество суммарной РНК определяли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) и реактива Qubit RNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific, США). Далее 1 мкг суммарной РНК обрабатывали 2 е.а. ДНКазы E («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали с помощью RevertAid RT Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, США) с использованием гексамерных праймеров. Для реакции обратной транскрипции использовали 500 нг суммарной РНК, выделенной из исследуемых клеточных линий. Реакцию обратной транскрипции проводили в объёме 25 мкл, далее готовили десятикратные разведения кДНК и выполняли амплификацию. В качестве контроля реакции обратной транскрипции использовали аналогичную реакционную смесь без обратной транскриптазы.

Количественная полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени проводили в амплификаторе АНК-32 («Синтол», Россия) с использованием набора 5^x qPCRmix-HS («Евроген», Россия) и с добавлением 1^x красителя SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific, США), или 1,25–5,0 мкМ красителя LUCS13 (Lumiprobe, Россия), или набора 5^x qPCRmix-HS-SYBR («Евроген», Россия). Структуры олигонуклеотидов, использованных в качестве праймеров, приведены в табл. 1. Амплификацию выполняли в таком

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидов для количественной полимеразной цепной реакции

Table 1. Sequence of oligonucleotides for quantitative polymerase chain reaction

Название	Последовательность 5'→3'
ACTB-F	CACCATTGGCAATGAGCGGTTCC
ACTB-R	GGTCTTTGCGGATGTCCACGT
IGF1-F	GCTGGTGGATGCTCTTCACT
IGF1-R	AGGGGTGCGCAATACATCTC
FGF2-F	AGTGTGTGCTAACCGTTACCT
FGF2-R	ACTGCCAGTTCGTTTCACTG
EIF3-F	ATCACCAGTGTGTTTGGGG
EIF3-R	TGGATGTCTGTGATCTGCCG

режиме: первичная денатурация 95 °C — 180 с, далее 40 циклов: 95 °C 10 с, 65 °C — 30 с с детекцией сигнала в канале SYBR/FAM. Кривые накопления сигнала анализировали с помощью программного обеспечения ANK Shell («Синтол», Россия). Для всех пар праймеров в ходе кПЦР использовали два отрицательных контроля: NTC (образец без матрицы) и NRT (в качестве матрицы для кПЦР добавляли образец, полученный без добавления обратной транскриптазы).

Петлевая изотермическая амплификация

Подбор праймеров для проведения изотермической амплификации проводили с помощью сервиса PrimerExplorer V5 [15] (табл. 2). LAMP выполняли в амплификаторе АНК-32 («Синтол», Россия) в объёме 25 мкл с использованием буферного раствора, состоящего из 20 мМ Tris-HCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 50 мМ KCl, 8 мМ MgSO₄, 0,1%

Tween 20, pH 8,8; 1,4 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфата, специфичных праймеров (0,2 мкМ F3/B3, 1,6 мкМ FIP/BIP, 0,4 мкМ LF/BF); 0,25–2,0 мкг рекомбинантной Bst-pol. В качестве интеркалирующего красителя использовали 1^x SYBR Green I или 1,25–5,0 мкМ LUCS13. Реакцию проводили при постоянной температуре 65 °C с детекцией сигнала в конце каждой минуты (30 с — инкубация, 30 с — инкубация с детекцией), таким образом дискретизация кривой накопления соответствовала 1 мин. Продолжительность реакции составляла 60 мин. Для всех наборов праймеров в ходе LAMP использовали два отрицательных контроля: NTC и NRT.

Статистический анализ

Для сравнения различий между выборками использовали U-критерий Манна-Уитни [16, 17], для количественной оценки взаимосвязи между группами данных

Таблица 2. Последовательность олигонуклеотидов для петлевой изотермической амплификации

Table 2. Sequence of oligonucleotides for loop-mediated isothermal amplification

Название	Последовательность 5'→3'
ACTB-F3	GCGCGGCTACAGCTTCA
ACTB-B3	GGAAGAGTGCCTCAGGGC
ACTB-FIP	AAGTCCAGGGCGACGTAGCACCGCCGAGCGGGAAAT
ACTB-BIP	GAGATGGCCACGGCTGCTTCCATTGCCAATGGT GATGACCT
ACTB-LF	TTCTCCTTAATGTCACGCACG
ACTB-LB	CCCTGGAGAAGAGCTACGAG
IGF1-F3	CGCCTCAGACAGGTATCGT
IGF1-B3	GGAGGGTCTTCTACATCCT
IGF1-FIP	CTTGGCAGGCTTGAGGGGTGGCTTCCGGAGCTGTGATC
IGF1-BIP	GCCACACCGACATGCCAAGACTCCCTCTACTGCGTTCT
IGF1-LF	CAATACATCTCCAGCCTCCT
IGF1-LB	ACCCAGAAGGAAGTACATTTGA
FGF2-F3	GCGACCCTCACATCAAGCTA
FGF2-B3	CGTTTCAGTGCCACATACCA
FGF2-FIP	CCTTCATAGCCAGGTAACGGCAGAAGAGAGAGGAGTTGTG
FGF2-BIP	ATGTGTTACGGATGAGTGTCTTCTGACCGGTAAGTATTGT
FGF2-LF	AGCACACACTCCTTTGATAG
FGF2-LB	TTGAACGATTGGAATCTAATAACT
EIF3-F3	GCGAAGGAGACCTCCTCTT
EIF3-B3	ACAGTCCCAGAGACGACAG
EIF3-FIP	TGCCCAGCCTCTACCATTCCTGTGGCCAAGGACCCTA
EIF3-BIP	CATGGGCCATACCGGAGCTGTGTGCTAGCTGAGCCAGTGA
EIF3-LF	ACAGAGTACCATACATTGACGA
EIF3-LB	TGTGGTGTGTGGACGCT

Примечание: F3/B3 — прямой и обратный праймеры, FIP/BIP — прямой и обратный внутренние праймеры, LF/LB — прямой и обратный петлевые праймеры.

Note: F3/B3 — forward and reverse primers, FIP/BIP — forward and reverse internal primers, LF/LB — forward and reverse loop primers.

применяли коэффициент корреляции Пирсона. Для этого использовали библиотеку SciPy [18] (язык программирования Python, v. 3.12; Python Software Foundation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение рекомбинантной Bst-pol

В ходе культивирования клеток *E. coli* Bl21-gold (DE3) с индуцированной экспрессией рекомбинантного гена показано накопление Bst-pol (~69,4 кДа) в цитоплазматической фракции клеток. За счёт двух стадий хроматографической очистки удалось получить рекомбинантный белок в чистом виде (рис. 1). Для дальнейшей работы использовали фракцию, содержащую наибольшее количество рекомбинантного белка (рис. 1, линия 7). Конечный выход рекомбинантного белка составил около 50 мг на литр бактериальной культуры.

Подбор условий для петлевой изотермической амплификации

В серии экспериментов по подбору концентрации фермента и интеркалирующего красителя для LAMP и кПЦР применяли праймеры, специфичные к гену бета-актина

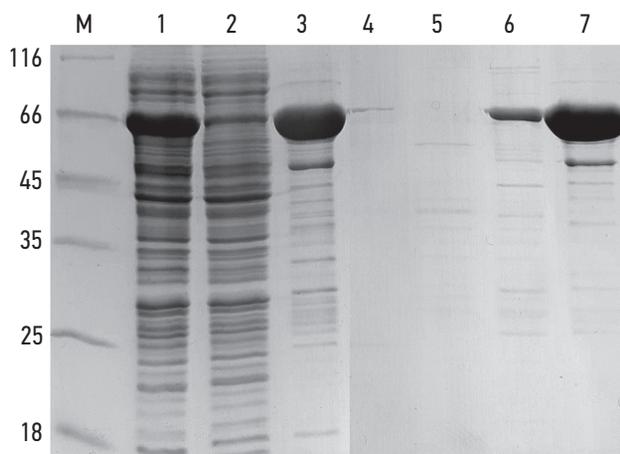


Рис. 1. Электрофореграмма разделения в денатурирующем 12% полиакриламидном геле выделенной Bst-pol. Окраска Ку-масси G-250. М — маркер молекулярных масс, кДа; 1 — клеточный лизат; 2 — фракция белков, не связавшихся с сорбентом при металл-хелатной хроматографии; 3 — фракция белков, связавшихся с сорбентом при металл-хелатной хроматографии; 4 — фракция белков, не связавшихся с сорбентом при ионообменной хроматографии; 5–7 — фракции белков, полученных при градиентной элюции в ходе ионообменной хроматографии.

Fig. 1. Electrophoregram of separation of isolated Bst-pol in denaturing 12% polyacrylamide gel. The staining was done using Coomassie G-250. M — molecular weight marker (kDa), 1 — cell lysate, 2 — fraction of proteins that did not bind to the sorbent during metal chelate chromatography, 3 — fraction of proteins that bound to the sorbent during metal chelate chromatography, 4 — fraction of proteins that did not bind to the sorbent during ion exchange chromatography, 5–7 — protein fractions obtained during gradient elution during ion exchange chromatography.

(ACTB) (см. табл. 2). В качестве интеркалирующего красителя использовали SYBR Green I или LUCS13. Использование SYBR Green I приводит к формированию нехарактерной для изотермической амплификации формы кривой накопления сигнала. Во всех случаях наблюдался сначала небольшой пик, затем провал, за которым следовал большой пик, уходящий в область отрицательных значений (рис. 2, a). В случае LUCS13 кривая накопления сигнала имела классическую S-образную форму (рис. 2, b). При использовании Bst-pol в концентрации 80 нг/мкг наблюдается провал в начале амплификации и дополнительный горб на кривой, исчезающий при меньших концентрациях фермента. Снижение концентрации фермента в два раза меняет форму кривой при сопоставимом значении порогового времени (см. рис. 2, b). При последующем уменьшении количества фермента происходит смещение кривой вправо, что соответствует большему времени реакции. На основании полученных результатов для последующих экспериментов была выбрана концентрация фермента 40 нг/мкл (1 мкг на реакцию), так как в этом случае, с одной стороны, кривая накопления сигнала имеет гладкую форму без заметных артефактов, а с другой стороны — обеспечивает минимально достигнутое время выхода. Далее была подобрана оптимальная концентрация LUCS13 для проведения реакции изотермической амплификации (рис. 2, c). Уменьшение количества красителя в два раза приводит к понижению уровня сигнала, а дальнейшее уменьшение его количества — к небольшому смещению порогового времени в сторону увеличения. Для дальнейших экспериментов использовали 1 мкг Bst-pol и 2,5 мкМ красителя LUCS13. Для прямого сравнения двух красителей в одинаковых условиях амплификации была проведена LAMP серии десятикратных разведений кДНК. Показано, что в случае использования красителя LUCS13 при разведении матрицы наблюдается равномерное смещение кривых накопления сигнала, в то время как при использовании красителя SYBR Green I смещение происходит неравномерно (рис. 2, d). При аналогичном сравнении красителей в случае кПЦР смещение кривых происходит равномерно на одинаковое количество циклов, что характеризуется одинаковой разностью между пороговыми циклами (ΔCt), однако различаются формы кривых в зависимости от красителя (рис. 2, e). В связи с тем, что при кПЦР краситель не сильно влияет на форму кривой накопления, в дальнейшем перешли на использование готовых наборов для кПЦР с красителем qPCRMix-HS-SYBR для упрощения пробоподготовки и повышения воспроизводимости результатов.

При анализе серии разведений методом кПЦР достоверно проявляются кривые накопления для разведений в $10-10^5$ раз. График зависимости порогового цикла от логарифма разведения кДНК-матрицы показывает линейную зависимость с коэффициентом детерминации ~0,99 (рис. 2, f, g). При анализе серии разведений методом LAMP достоверно определяются кривые накопления

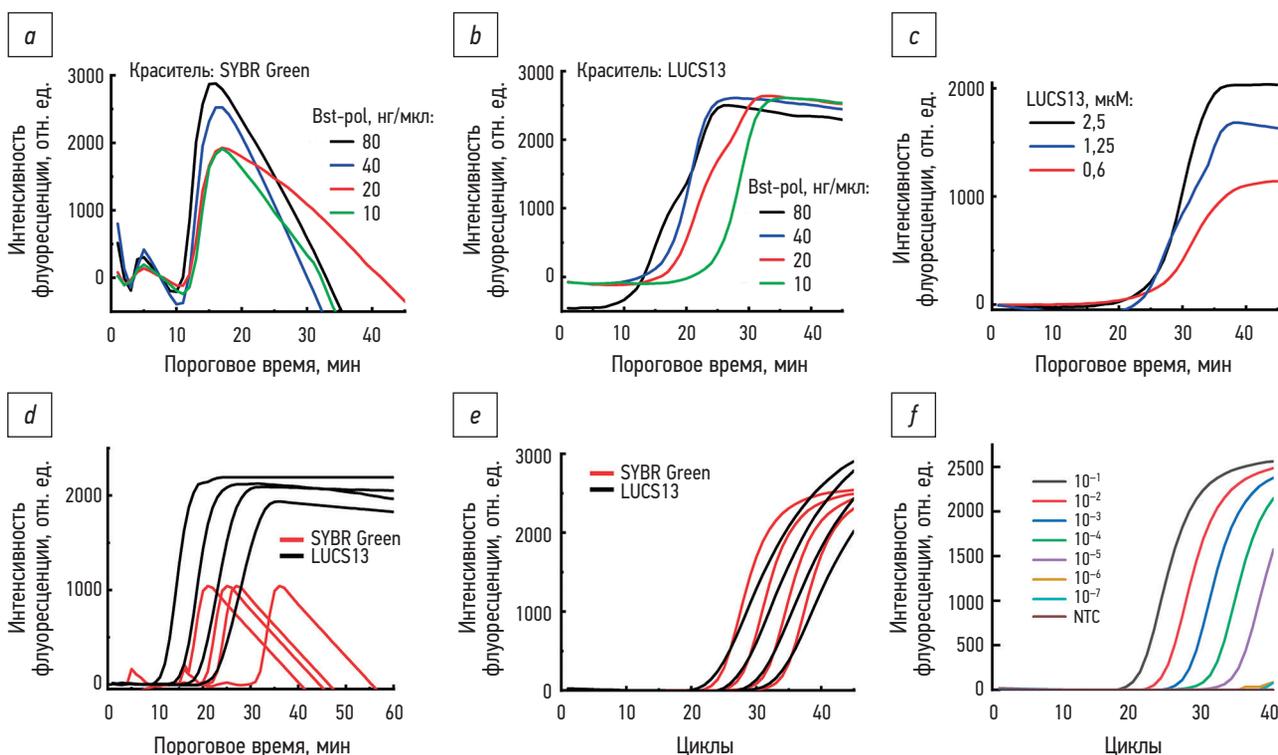


Рис. 2. Подбор оптимальных условий проведения реакций петлевой изотермической амплификации (LAMP) и количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР): *a* — оценка влияния количества Bst-pol на значение порогового времени (краситель — 1 \times SYBR Green I); *b* — оценка влияния количества Bst-pol на значение порогового времени (краситель — LUCS13); *c* — оценка влияния количества красителя LUCS13 на форму кривой накопления сигнала; *d* — LAMP серии десятикратных разведений комплементарной ДНК (кДНК), полученной из суммарной РНК клеток Expi293, мишень — ген бета-актина; *e* — кПЦР серии десятикратных разведений кДНК, полученной из суммарной РНК клеток Expi293, мишень — ген бета-актина; *f* — кривые накопления сигнала кПЦР при анализе десятикратных разведений матрицы кДНК; *g* — график зависимости среднего значения порогового цикла от десятичного логарифма разведения матрицы при кПЦР; *h* — кривые накопления сигнала LAMP при анализе десятикратных разведений матрицы кДНК, краситель LUCS13 (2,5 мкМ); *i* — график зависимости среднего значения порогового цикла от десятичного логарифма разведения матрицы при LAMP; *j* — кривые плавления ПЦР-продуктов, полученных в ходе кПЦР, $-d(\text{ОИФ})/dt$ — производная флуоресценции по температуре, 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} — кривые плавления ПЦР-продуктов, индексы соответствуют фактору разведения кДНК, полученной из суммарной РНК клеток Expi293, контроль — кривая плавления для контрольного образца (в качестве матрицы использовали ПЦР-продукт, полученный с использованием пары праймеров ACTB-F/ACTB-R); *k* — электрофоретическое разделения продуктов амплификации в ходе LAMP; *l* — электрофоретическое разделения продуктов амплификации в ходе кПЦР. На рис. *d*, *e*: чёрные линии — краситель LUCS13 (2,5 мкМ), красные линии — краситель SYBR Green I; на рис. *f*, *h*: NTC — контроль без матрицы; на рис. *g*, *i*: R^2 — коэффициент детерминации; на рис. *k*, *l*: 1 — контрольный образец (в качестве матрицы использовали ПЦР-продукт, полученный с использованием пары праймеров ACTB-F3/ACTB-B3); 2, 3 — ПЦР-продукты из разведений кДНК 10^{-1} и 10^{-5} , полученной из суммарной РНК клеток Expi293; 4 — образец NRT, 5 — образец NTC; M — маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, США), числами указана длина некоторых полос (п. н.).

Fig. 2. Optimization of conditions for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR): *a* — impact assessment of the Bst-pol amount on the threshold time value, dye — 1 \times SYBR Green I; *b* — impact assessment of the Bst-pol amount on the threshold time value, dye — LUCS13; *c* — impact assessment of the LUCS13 dye amount on the shape of the signal accumulation curve; *d* — LAMP series of tenfold dilutions of complementary DNA (cDNA) obtained from the total RNA of Expi293 cells, the target is the beta actin gene; *e* — qPCR of a series of tenfold dilutions of cDNA obtained from the total RNA of Expi293 cells, the target is the beta actin gene; *f* — curves of accumulation of the qPCR signal in the analysis of tenfold dilutions of the cDNA matrix; *g* — dependency graph of the average value of the threshold cycle on the decimal logarithm of matrix dilution at qPCR; *h* — LAMP signal accumulation curves in the analysis of tenfold dilutions of the cDNA matrix, LUCS13 dye (2.5 μM); *i* — dependency graph of the average value of the threshold cycle on the decimal logarithm of the matrix dilution at LAMP; *j* — melting curves of PCR products obtained during qPCR, $-d(\text{OIF})/dt$ — derivative of fluorescence with respect to temperature, 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} melting curves of PCR products, indices correspond to the dilution factor of cDNA obtained from total RNA of Expi293 cells, control — melting curve for the control sample (PCR product obtained using the ACTB-F/ACTB-R primer pair was used as the template); *k* — electrophoretic separation of amplification products during LAMP; *l* — electrophoretic separation of amplification products during qPCR. Fig. *d*, *e*: black lines — LUCS13 dye (2.5 μM), red lines — SYBR Green I dye; fig. *f*, *h*: NTC — control without a matrix; fig. *g*, *i*: R^2 — coefficient of determination; fig. *k*, *l*: 1 — control sample (PCR product obtained using the ACTB-F3/ACTB-B3 primer pair was used as the template), 2, 3 — PCR products obtained from 10^{-1} and 10^{-5} dilutions of cDNA obtained from total RNA of Expi293 cells, 4 — NRT sample, 5 — NTC sample; M — GeneRuler DNA Ladder Mix marker (Thermo Fisher Scientific, USA), numbers indicate the length of some bands (bp).

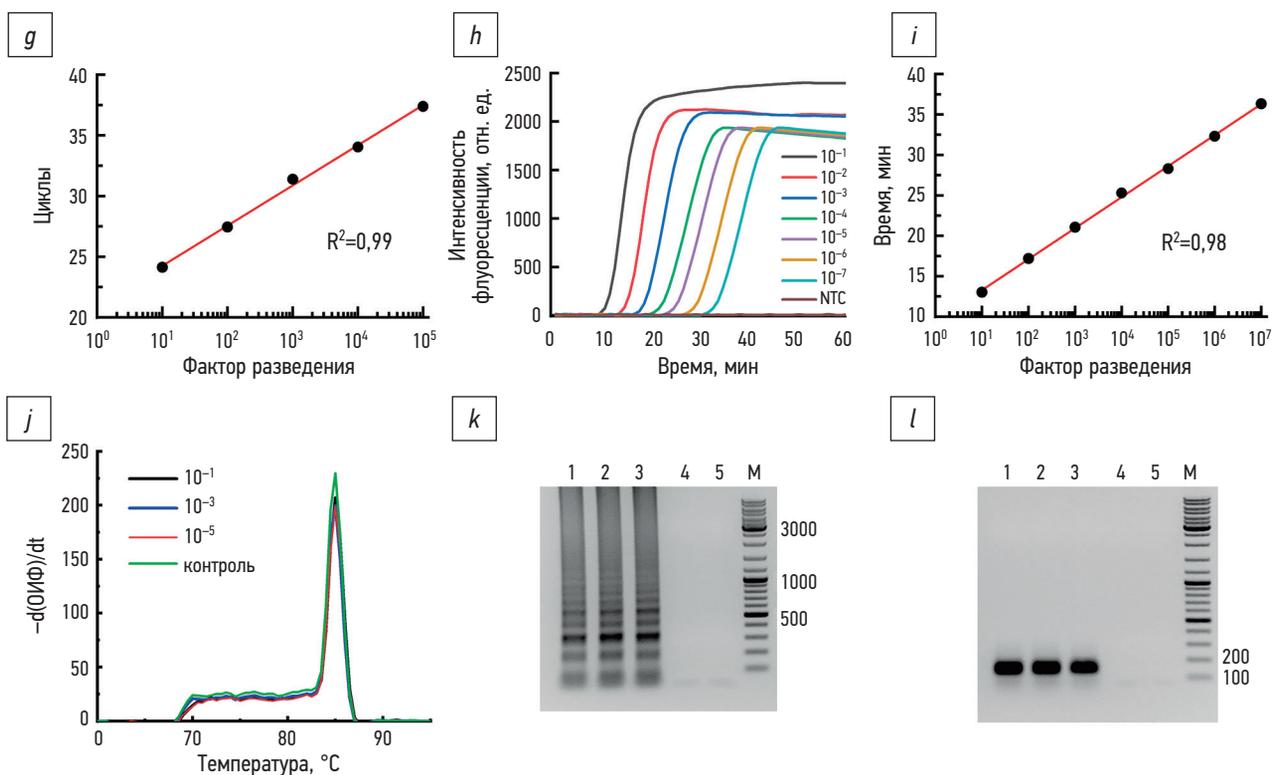


Рис. 2. Окончание.
Fig. 2. The End.

для разведений в 10^{-10^7} раз. График зависимости времени выхода кривой от логарифма разведения ДНК-матрицы также показывает линейную зависимость с коэффициентом детерминации $\sim 0,98$ (рис. 2, *h, i*). Определено, что в случае кПЦР при десятикратном шаге разведений разница порогового цикла (ΔCt) соответствует $3,3 \pm 0,5$ цикла, в случае LAMP при десятикратном разведении разница порогового времени (ΔTt) составляет $3,9 \pm 0,5$ мин.

Для валидации данных, полученных в ходе кПЦР и LAMP, были амплифицированы фрагменты ДНК с использованием пар праймеров АСТВ-Ф/АСТВ-Р и АСТВ-Ф3/АСТВ-Р3 соответственно. Последовательности верифицированы секвенированием по Сэнгеру. Полученные фрагменты ДНК использовали в качестве контрольной матрицы при амплификации. В ходе анализа кривых плавления, полученных при амплификации контрольной матрицы и разведений кДНК, была обнаружена сходимость пиков, подтверждающих специфичность праймеров (рис. 2, *j*). Кроме того, при электрофоретическом разделении продуктов ПЦР также было показано наличие целевой полосы в контрольном и исследуемых образцах. Отрицательные контроли (контроль, содержащий все компоненты ПЦР-смеси, кроме матрицы, — NTC — и контроль, полученный при проведении реакции обратной транскрипции без добавления обратной транскриптазы — NRT) при этом не содержали никаких продуктов амплификации (рис. 2, *l*). Электрофоретическое разделение продуктов LAMP в агарозном геле показало идентичность (соответствие полос) контрольного

и исследуемых образцов, а также отсутствие сигнала в отрицательных контролях (рис. 2, *k*).

Оценка экспрессии генов ростовых факторов

Для оценки уровня экспрессии генов ростовых факторов *IGF-1*, *FGF-2*, *EIF3i* в клеточных линиях выделена суммарная РНК из клеток Expi293, а также модифицированных клеточных линий с активированной экспрессией одного из генов ростовых факторов: Expi293-IGF1, Expi293-FGF2, Expi293-EIF3. Далее была получена кДНК и определено изменение значений порогового времени и порогового цикла при анализе серии десятикратных разведений кДНК для соответствующего набора праймеров (табл. 3, 4). Каждый образец анализировали в четырёх повторах.

При сравнении двух методов для каждого исследуемого образца получено по два значения: пороговое время/цикл для исследуемого гена и пороговое время/цикл для референсного гена. В качестве матрицы использовали стократное разведение кДНК. Далее для каждого исследуемого гена были рассчитаны отношения значений порогового цикла/времени исследуемого гена к значению референсного гена. Полученные отношения для кПЦР и LAMP для каждого гена сравнивали между собой (рис. 3, *a*). Статистически значимых различий между используемыми методами не выявлено. Для сравнения двух методов при анализе экспрессии генов ростовых факторов также проводили корреляционный анализ (рис. 3, *b*). Показан высокий уровень корреляции (96,7%) между

Таблица 3. Средние значения пороговых циклов и порогового времени при анализе серии разведений комплементарной ДНК методами количественной полимеразной цепной реакции и петлевой изотермической амплификации

Table 3. Average Ct and Tt values in complementary DNA dilution series assay with quantitative polymerase chain reaction and loop-mediated isothermal amplification

Разведение комплементарной ДНК	Метод	Ген			
		<i>ACTB</i>	<i>IGF1</i>	<i>FGF2</i>	<i>EIF3i</i>
10 ⁻¹	Ct, цикл	24,1±0,1	21,3±0,5	25,5±0,2	22,1±0,3
	Tt, мин	13,0±0,2	15,0±1,5	21,5±0,2	19,5±0,7
10 ⁻²	Ct, цикл	27,5±0,3	24,5±0,4	28,8±0,2	25,4±0,3
	Tt, мин	17,2±0,3	18,9±1,8	25,2±1,8	23,0±1,2
10 ⁻³	Ct, цикл	31,4±0,2	27,9±0,6	32,0±0,4	28,8±0,2
	Tt, мин	21,1±0,7	23,1±1,5	29,1±2,1	27,5±1,8
10 ⁻⁴	Ct, цикл	34,0±0,2	31,2±0,3	35,6±0,5	32,2±0,2
	Tt, мин	25,3±0,5	27,0±1,5	33,0±1,3	31,4±1,5
10 ⁻⁵	Ct, цикл	37,4±0,2	35,0±0,3	38,5±0,4	35,6±0,4
	Tt, мин	28,3±0,5	31,1±1,3	37,1±1,1	35,9±1,4
10 ⁻⁶	Ct, цикл	Нд	38,2±0,4	Нд	38,3±0,4
	Tt, мин	32,3±0,3	35,1±1,7	41,1±0,5	39,1±0,9
10 ⁻⁷	Ct, цикл	Нд	Нд	Нд	Нд
	Tt, мин	36,3±0,6	39,0±1,8	44,8±1,1	42,7±0,2
Среднее изменение	ΔCt, цикл	3,3±0,5	3,4±0,2	3,3±0,1	3,4±0,1
	ΔTt, мин	3,9±0,5	4,0±0,2	4,0±0,2	3,9±0,4

Примечание: Ct — пороговый цикл реакции количественной полимеразной цепной реакции; Tt — пороговое время петлевой изотермической амплификации, данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение; Нд — нет данных, кривая накопления сигнала ниже пороговой линии. Количество повторов, $n=4$. *ACTB* — ген бета актина человека, *IGF1* — ген инсулиноподобного фактора роста 1, *FGF2* — ген фактора роста фибробластов, *EIF3i* — ген эукариотического фактора инициации трансляции 3 (субъединица i).

Note: Ct — the threshold cycle of the real-time polymerase chain reaction; Tt — the threshold time of loop isothermal amplification, the data are presented as: mean ± standard deviation; Нд — no data, the signal accumulation curve is below the threshold line. The number of repeats, $n=4$. *ACTB* — human β -actin gene, *IGF1* — insulin-like growth factor 1 gene, *FGF2* — fibroblast growth factor 2 gene, *EIF3i* — eukaryotic translation initiation factor 3 (subunit i) gene.

данными кПЦР и LAMP, что позволяет использовать метод LAMP для быстрого анализа уровня экспрессии генов. Кроме того, из рисунка 3, *b* видно, что наибольшее значение порогового времени составляет 31 мин при наибольшем среднем значении 30,7±2,8 мин, что позволяет проводить анализ экспрессии генов в течение 35 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы LAMP зарекомендовала себя как высокочувствительный и быстрый метод детекции нуклеиновых кислот. В отличие от кПЦР, LAMP выполняется при постоянной температуре, что упрощает и ускоряет процесс амплификации, делая его более доступным и более быстрым. Этот метод широко применяется в анализе клинических образцов при диагностике инфекционных заболеваний, так как позволяет получить результаты за короткое время с высокой точностью. В рутинной работе часто требуется оперативная оценка состояния клеточных культур для обеспечения эффективного

производства рекомбинантных белков и других продуктов фармацевтической промышленности. В рамках данной задачи мы решили использовать метод количественной LAMP с детекцией в режиме реального времени для анализа уровня экспрессии генов в клеточных линиях. Ранее нами были созданы и охарактеризованы клеточные линии с активированной экспрессией генов ростовых факторов методом геномного редактирования с применением системы CRISPR/Cas9 SAM [13]. Мы использовали клеточные линии с известным уровнем экспрессии генов *IGF-1*, *FGF-2*, *EIF3i* для подбора условий проведения LAMP, чтобы оценить надёжность и воспроизводимость выбранного нами подхода. На первом этапе мы получили рекомбинантный большой фрагмент ДНК-полимеразы *Bacillus stearothermophilus*. Были подобраны условия культивирования в настольном биореакторе и выделения Bst-pol с конечным выходом рекомбинантного белка около 50 мг на литр бактериальной культуры (см. рис. 1). Производство собственного рекомбинантного белка Bst-pol в рамках программы импортозамещения и в условиях

Таблица 4. Значения порогового времени и пороговых циклов для всех исследуемых образцов при анализе серии разведений комплементарной ДНК методами количественной полимеразной цепной реакции и петлевой изотермической амплификации

Table 4. Ct and Tt values for all repeats in complementary DNA dilution series assay with quantitative polymerase chain reaction and loop-mediated isothermal amplification

Разведение комплементарной ДНК	ACTB		IGF1		FGF2		EIF3i	
	Ct, цикл	Tt, мин						
10 ⁻¹	24,1	13,3	21,2	13,9	25,5	21,7	22,1	20,2
	24,2	13,0	22,0	13,7	25,2	21,2	21,8	20,0
	24,1	12,9	20,9	16,9	25,5	21,6	22,5	19,1
	24,0	12,9	21,1	15,5	25,7	21,5	22,0	18,7
10 ⁻²	27,7	17,2	24,5	16,3	29,0	26,7	25,8	23,5
	27,2	17,3	25,1	19,2	28,9	22,6	25,1	21,9
	27,3	16,8	24,3	20,5	28,6	25,6	25,5	22,2
	27,8	17,5	24,1	19,6	28,8	25,9	25,2	24,5
10 ⁻³	31,5	20,95	28,2	22,5	32,2	32,2	28,8	29,6
	31,6	21,07	28,4	21,8	32,4	27,7	29,1	26,5
	31,2	20,34	27,1	25,3	31,5	28,5	28,7	28,3
	31,3	22,03	28,0	22,8	31,9	28,0	28,6	25,6
10 ⁻⁴	34,2	25,3	31,4	26,7	35,2	33,1	32,5	31,1
	33,8	25,9	31,4	25,9	36,1	34,1	32,3	31,8
	33,9	25,4	30,8	29,2	35,9	33,6	32,1	29,5
	34,1	24,6	31,2	26,2	35,1	31,1	32,0	33,1
10 ⁻⁵	37,6	28,5	35,1	29,5	38,2	37,8	35,5	35,4
	37,1	27,8	35,1	30,8	38,2	38,0	35,3	37,7
	37,5	28,9	34,6	32,6	39,0	37,1	36,2	34,4
	37,5	28,0	35,2	31,6	38,7	35,6	35,4	36,1
10 ⁻⁶		32,4	38,0	33,0		41,2	38,5	39,5
	Нд	32,1	37,9	36,6	Нд	41,6	38,7	40,2
		32,7	38,1	34,4		40,4	37,8	38,4
		31,9	38,8	36,3		41,1	38,2	38,3
10 ⁻⁷		36,7		41,1		44,5		42,9
	Нд	35,5	Нд	36,9	Нд	45,0	Нд	42,5
		36,1		39,6		46,2		42,6
		36,9		38,3		43,5		42,9

Примечание: Ct — пороговый цикл реакции количественной полимеразной цепной реакции; Tt — пороговое время петлевой изотермической амплификации; Нд — нет данных, кривая накопления сигнала ниже пороговой линии. Количество повторов, $n=4$. ACTB — ген бета актина человека, IGF1 — ген инсулиноподобного фактора роста 1, FGF2 — ген фактора роста фибробластов, EIF3i — ген эукариотического фактора инициации трансляции 3 (субъединица i).

Note: Ct — the threshold cycle of the real-time polymerase chain reaction; Tt — the threshold time of loop isothermal amplification; Нд — no data, the signal accumulation curve is below the threshold line. The number of repeats, $n=4$. ACTB — human β -actin gene, IGF1 — insulin-like growth factor 1 gene, FGF2 — fibroblast growth factor 2 gene, EIF3i — eukaryotic translation initiation factor 3 (subunit i) gene.

санкционных ограничений позволяет обеспечить стабильность биотехнологических проектов. Следующим этапом стала детальная характеристика полученного фермента для подтверждения его функциональной активности. Мы провели серию экспериментов с целью подбора условий проведения LAMP для выделенной рекомбинантной

Bst-pol. В нашей работе определена оптимальная концентрация Bst-pol — 40 нг/мкл, что в пересчёте на одну реакцию составляет 1 мкг фермента (см. рис. 2, а, б). Эта концентрация выше, чем обычно указывается в некоторых стандартных протоколах LAMP. Например, протокол NEB «Typical LAMP Protocol» предлагает использовать 320 е.а.

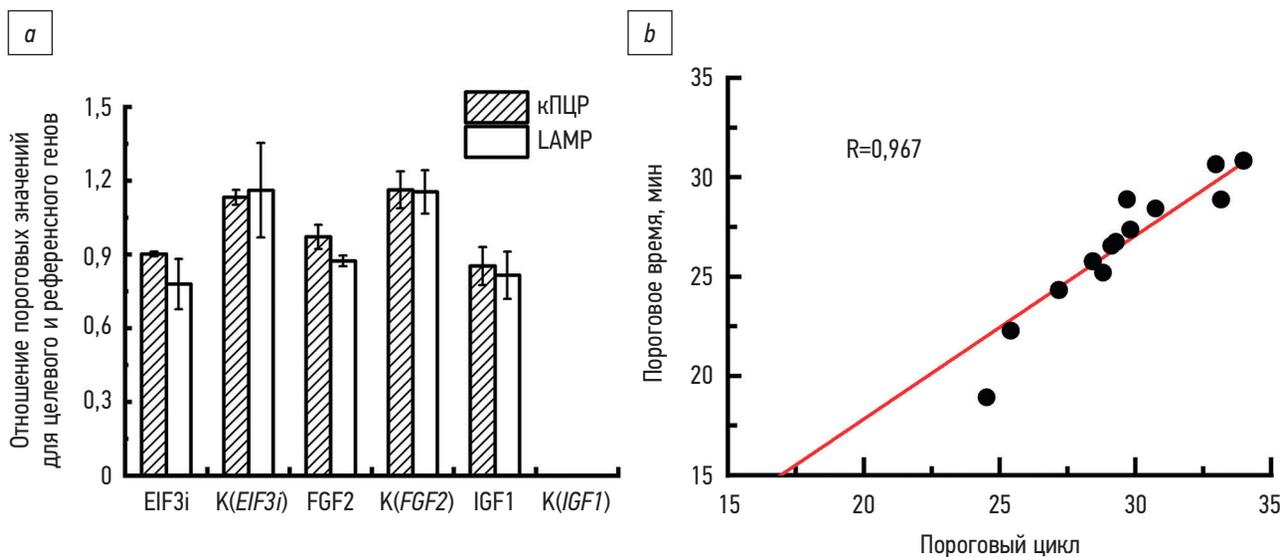


Рис. 3. Сравнение количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) и петлевой изотермической амплификации (LAMP) при анализе экспрессии генов ростовых факторов: *a* — гистограмма отношений значений порогового цикла/времени исследуемого гена к значению порогового цикла/времени референсного гена; К — клетки Expi293, в скобках указано название анализируемого гена; EIF3i, FGF2, IGF1 — клетки линий Expi293-EIF3, Expi293-FGF2, Expi293-IGF1 соответственно; *b* — корреляционный анализ данных уровней экспрессии генов ростовых факторов в клетках Expi293. R — коэффициент корреляции.

Fig. 3. Comparison of quantitative polymerase chain reaction (кПЦР) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) while analyzing gene expression of growth factors: *a* — histogram of the ratio of the values of the threshold cycle/time of the studied gene to the value of the threshold cycle/time of the reference gene; K — cells Expi293, the name of the analyzed gene is indicated in parentheses; EIF3i, FGF2, IGF1 — cells of the lines Expi293-EIF3, Expi293-FGF2, Expi293-IGF1, respectively; *b* — correlation analysis of these expression levels genes of growth factors in cells Expi293. R — correlation coefficient.

в реакции объёмом 25 мкл, что соответствует ~67 нг фермента при удельной активности фермента 120000 е.а./мг [19]. В нашем случае расчётная удельная активность фермента составляла 8000 е.а./мг. В других работах использовали 20 пмоль фермента в реакции, что соответствует ~1,34 мкг фермента [20], кроме того, в некоторых исследованиях удельная активность полученной Bst-pol составляла от 813,56 е.а./мг [21] до 150 000 е.а./мг [22]. При использовании в LAMP интеркалирующего красителя SYBR Green I мы обнаружили аномальное изменение кривой накопления сигнала, что выражается в уменьшении уровня флуоресценции (после достижения максимального уровня), уходящего в некоторых случаях в область отрицательных значений. Это делает невозможной автоматическую обработку результатов, так как кривая пересекает пороговую линию два раза (см. рис. 2, *a*), а также происходит неравномерное смещение кривой относительно временной шкалы при разведении исходных образцов кДНК (см. рис. 2, *d*). Ингибирование LAMP SYBR Green I уже описано ранее в литературе. Например, в ходе исследования ингибирования LAMP различными красителями SYBR Green I был отнесён к группе красителей с сильным ингибирующим эффектом, а такие красители, как SYTO9, SYTO13, SYTO16 и другие, не обладали таким эффектом [23]. В связи с этим для проведения LAMP мы использовали отечественный аналог SYTO13 — краситель LUCS13 [24]. Нами установлено, что интеркалирующий краситель LUCS13 в концентрации 2,5 мкМ позволяет добиться

нормальной формы кривой накопления и воспроизводимых результатов при проведении LAMP (см. рис. 2, *c*). При использовании данного красителя наблюдается стабильное нарастание флуоресцентного сигнала, что позволяет получить качественную кривую накопления сигнала для определения значений порогового времени реакции. В то же время при использовании красителя LUCS13 в кПЦР наблюдается небольшое изменение формы кривой накопления сигнала (см. рис. 2, *e*), однако это искажение не влияет на значение порогового цикла реакции. Далее мы проводили анализ чувствительности и точности LAMP и кПЦР при использовании различных разведений кДНК-матрицы. Результаты показали, что метод кПЦР позволяет детектировать целевой ген при разведении матрицы от 10 до 10⁵ раз (см. рис. 2, *f*), в то время как метод LAMP позволяет детектировать целевой ген в более широком диапазоне разведений — от 10 до 10⁷ (см. рис. 2, *h*). Это согласуется с результатами других исследований, которые также сообщают о высокой чувствительности метода LAMP при определении низких концентраций целевой ДНК, превышающей ПЦР в 100 раз [25, 26]. Значительные различия в механизмах амплификации этих методов могут объясняться различиями в чувствительности. В реакции LAMP используется три пары праймеров, что значительно повышает специфичность и чувствительность метода. Это отличает LAMP от кПЦР, где используется одна пара праймеров. Дополнительные праймеры в LAMP создают большее количество точек

инициации для синтеза ДНК, что способствует ускорению реакции и увеличению общей чувствительности метода. При анализе десятикратных разведений кДНК-матрицы разница порогового цикла (ΔCt) для кПЦР составляет $3,3 \pm 0,5$ цикла, что хорошо соответствует теоретически ожидаемому значению 3,32 цикла при 100% эффективности амплификации. Этот результат свидетельствует о высокой точности и воспроизводимости метода кПЦР, что подтверждается также линейной зависимостью Ct от логарифма разведения ДНК-матрицы и коэффициентом детерминации $\sim 0,99$ (см. рис. 2, *g*). Такое соответствие между экспериментальными и теоретическими данными подчёркивает стабильность и надёжность кПЦР при анализе концентраций ДНК. Для LAMP, несмотря на другой принцип амплификации, также была выявлена линейная зависимость между пороговым временем и логарифмом разведения кДНК, с коэффициентом детерминации $\sim 0,98$ (см. рис. 2, *i*). Для метода LAMP разница порогового времени при анализе десятикратных разведений кДНК составила $3,9 \pm 0,5$ мин, что также свидетельствует о высокой точности метода, хотя и с несколько большей вариацией. Значения ΔTt могут отличаться при использовании различных *Bst-pol*. Некоторые исследования демонстрируют изменения ΔTt при анализе серии десятикратных разведений от $3,5 \pm 1,7$ мин [27] до $5,1 \pm 0,8$ мин [25]. Таким образом, полученные результаты подтверждают высокую точность и чувствительность как кПЦР, так и LAMP, при этом LAMP демонстрирует более широкий диапазон детекции (см. рис. 2, *h*). Мы также подтвердили специфичность подобранных наборов праймеров. Анализ кривых плавления, полученных как для контрольной матрицы, так и для серийных разведений кДНК, показал сходные пики, подтверждающие специфичность амплификации в обоих методах (см. рис. 2, *j*). Данный этап кПЦР является обязательным при использовании интеркалирующих красителей, поскольку невозможно отличить кривые накопления сигнала, получаемые при амплификации целевых продуктов, от нецелевых или димеров праймеров. Специфичность амплифицированных продуктов также была подтверждена методом электрофореза в агарозном геле: как в контрольных, так и в исследуемых образцах присутствовали целевые полосы, соответствующие ожидаемым продуктам амплификации (см. рис. 2, *l*). При проведении LAMP возникает проблема анализа кривых плавления, поскольку в ходе этой процедуры конечный продукт представляет собой смесь различных форм амплифицированной ДНК, включая конкатемеры — длинные цепи, состоящие из многократно повторённых целевых последовательностей. Для верификации были проанализированы продукты амплификации в агарозном геле (см. рис. 2, *k*). Идентичность получаемых продуктов в ходе амплификации контрольных и исследуемых образцов подтвердила специфичность подобранных праймеров.

Далее мы сравнили методы LAMP и кПЦР при анализе экспрессии генов ростовых факторов. С этой целью

мы использовали клеточные линии Expi293 с активированной экспрессией генов *IGF-1*, *FGF2*, *EIF3i* с помощью системы синергичных медиаторов активации CRISPR/Cas9 SAM. С целью количественного анализа экспрессии целевых генов подобраны специфические праймеры как для кПЦР, так и для LAMP; для каждого набора праймеров и соответствующей матрицы кДНК определены значения Ct , Tt , а также ΔCt и ΔTt для серии десятикратных разведений матрицы (см. табл. 3). Результаты анализа показали, что статистически значимых различий между значениями ΔCt , а также между значениями ΔTt для различных наборов праймеров нет, что позволяет использовать оба метода для количественного сравнения изменения уровня экспрессии целевых генов. Для взаимного сравнения двух методов данные кПЦР и LAMP нормировали путём расчёта отношения значений порогового цикла/времени для исследуемого гена к значению для референсного гена *ACTB*. Полученные отношения для кПЦР и LAMP сравнивали между собой (см. рис. 3, *a*). Показано отсутствие статистически значимых различий между нормализованными значениями Ct и Tt , что свидетельствует о сопоставимой точности обоих методов. Кроме того, для оценки двух методов был проведён корреляционный анализ (см. рис. 3, *b*). Высокий уровень корреляции (96,7%) между данными кПЦР и LAMP подтверждает, что метод LAMP может быть использован как альтернативный и быстрый способ анализа уровня экспрессии генов.

Полученные данные (см. табл. 3) также показывают, что наибольшее значение порогового времени для метода LAMP составляет $30,7 \pm 2,8$ мин. Это указывает на то, что анализ экспрессии генов с использованием метода LAMP может быть проведён в течение 35 мин, что значительно сокращает время анализа по сравнению с кПЦР, которая обычно занимает 90 мин.

Метод LAMP позволяет детектировать небольшие количества целевой матрицы в образцах, что даёт преимущества при оценке уровня экспрессии генов. Несмотря на высокую чувствительность метода, простоту постановки и большую скорость реакции, в настоящее время существует ряд трудностей для полноценной замены метода кПЦР. Основным преимуществом кПЦР является дискретность метода, в котором на фоне 100% эффективности работы праймеров количество матрицы удваивается при каждом цикле [28]. Дискретность метода позволяет также проводить нормализацию данных, необходимую для количественной оценки изменения уровня экспрессии. LAMP же проходит непрерывно, что затрудняет количественную оценку уровня экспрессии, поскольку отсутствие дискретных циклов, как в кПЦР, ограничивает возможности для точной нормализации данных. Таким образом, метод LAMP допустимо использовать для быстрой полуколичественной оценки уровня экспрессии целевого гена относительно референсного гена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод LAMP даёт ряд преимуществ по сравнению с кПЦР, которые делают его привлекательной альтернативой в различных биотехнологических приложениях. Высокая скорость, простота и доступность метода LAMP наряду с его чувствительностью и специфичностью делают его ценным инструментом для мониторинга состояния клеточных культур, диагностики и контроля качества, а также исследований в области молекулярной биологии. Таким образом, оба метода могут быть использованы в зависимости от конкретной задачи и требований исследования.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ



Приложение 1. Карта плазмиды pET-BstPoll-NHis и аминокислотная последовательность рекомбинантной Bst-pol.

doi: 10.17816/gc635661-4224323

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 23-24-00012, <https://rscf.ru/project/23-24-00012/>).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: П.А. Бобровский — обзор литературы, экспериментальные процедуры, написание текста и редактирование статьи; Е.Н. Графская — культуральные работы и редактирование статьи; Д.Д. Харлампиева — экспериментальные процедуры, анализ данных; Г.Ю. Фисунов — сборка генетических конструкций; В.А. Манувера — выделение

рекомбинантного белка, написание текста и редактирование статьи; В.Н. Лазарев — организация и проведение исследования, финальное редактирование текста статьи.

Благодарности. Результаты получены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования «Геномика, протеомика, метаболомика» федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина федерального медико-биологического агентства (<http://rcpcm.org/?p=2806>).

ADDITIONAL INFORMATION



Supplement 1. Plasmid map of pET-BstPoll-NHis and Amino acid sequence of recombinant Bst-pol.

doi: 10.17816/gc635661-4224323

Funding source. This research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-24-00012, <https://rscf.ru/project/23-24-00012/>).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication). P.A. Bobrovsky — literature review, experimental procedures, text writing, and manuscript editing; E.N. Grafkskaia — cultural work and manuscript editing; D.D. Kharlampieva — experimental procedures, data analysis; G.Yu. Fisunov — genetic construct assembly; V.A. Manuvera — recombinant protein purification, text writing, and manuscript editing; V.N. Lazarev — organization and conduct of the study, final editing of the manuscript.

Acknowledgments. This work was performed using the core facilities of the Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency PCM "Genomics, proteomics, metabolomics" (<http://rcpcm.org/?p=2806>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tan E., Chin C.S.H., Lim Z.F.S., Ng S.K. HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors // *Front Bioeng Biotechnol.* 2021. Vol. 9. P. 796991. doi: 10.3389/fbioe.2021.796991
2. Demirten S.F., Kimiz-Gebologlu I., Oncel S.S. Animal cell lines as expression platforms in viral vaccine production: A post Covid-19 perspective // *ACS Omega.* 2024. Vol. 9, N. 15. P. 16904–16926. doi: 10.1021/acsomega.3c10484
3. Merten O.W. Development of stable packaging and producer cell lines for the production of AAV vectors // *Microorganisms.* 2024. Vol. 12, N. 2. P. 384. doi: 10.3390/microorganisms12020384
4. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, N. 12. P. E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63
5. Naddaf R., Ben-Assa N., Gefen T., et al. A protocol for simple, rapid, and direct detection of SARS-CoV-2 from clinical samples, using reverse transcribed loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) // *Bio Protoc.* 2020. Vol. 10, N. 20. P. e3789. doi: 10.21769/BioProtoc.3789
6. Park G.S., Baek S.H., Ku K., et al. Colorimetric RT-LAMP methods to detect severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) // *Bio Protoc.* 2020. Vol. 10, N. 21. P. e3804. doi: 10.21769/BioProtoc.3804
7. Anahtar M.N., Mcgrath G.E.G., Rabe B.A., et al. Clinical assessment and validation of a rapid and sensitive SARS-CoV-2 test using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification without the need for RNA extraction // *Open Forum Infect Dis.* 2020. Vol. 8, N. 2. P. ofaa631. doi: 10.1093/ofid/ofaa631

8. Takayama I., Nakauchi M., Takahashi H., et al. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus // *J Virol Methods*. 2019. Vol. 267. P. 53–58. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.02.010
9. Huang X., Tang G., Ismail N., Wang X. Developing RT-LAMP assays for rapid diagnosis of SARS-CoV-2 in saliva // *EBioMedicine*. 2022. Vol. 75. P. 103736. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103736
10. Thiessen L.D., Neill T.M., Mahaffee W.F. Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the field detection of *Erysiphe necator* // *PeerJ*. 2018. Vol. 6. P. e4639. doi: 10.7717/peerj.4639
11. Jiang L., Lan X., Ren L., et al. Design of a digital LAMP detection platform based on droplet microfluidic technology // *Micromachines* (Basel). 2023. Vol. 14, N. 5. P. 1077. doi: 10.3390/mi14051077
12. Lin X., Huang X., Urmann K., et al. Digital loop-mediated isothermal amplification on a commercial membrane // *ACS Sens*. 2019. Vol. 4, N. 1. P. 242–249. doi: 10.1021/acssensors.8b01419
13. Бобровский П.А., Графская Е.Н., Харлампиева Д.Д., и др. Специфичная активация экспрессии генов ростовых факторов в линии клеток человека Expi293F с помощью технологии CRISPR/Cas9-SAM приводит к повышению пролиферации // *Acta Naturae*. 2024. Т. 16, № 3. С. 25–37. EDN: AKHHBB doi: 10.32607/actanaturae.27415
14. Ong J., Evans T.C., Tanner N., inventors; New England Biolabs Inc., assignee. DNA polymerases. United States Patent US 8993298B1. 2015.
15. Primerexplorer.jp [Internet]. LAMP primer designing software PrimerExplorer V5. Доступ по ссылке: <https://primerexplorer.jp/e/> Дата обращения: 23.08.2024.
16. Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other // *Ann Math Statist*. 1947. Vol. 18, N. 1. P. 50–60. doi: 10.1214/aoms/1177730491
17. Mcknight P., Najab J. Mann-Whitney U Test. In: Weiner I.B., Craighead W.E., editors. *The Corsini encyclopedia of psychology* (4th edition). John Wiley, 2010. doi: 10.1002/9780470479216.corpsy0524
18. Virtanen P., Gommers R., Oliphant T.E., et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python // *Nat Methods*. 2020. Vol. 17, N. 3. P. 352. doi: 10.1038/s41592-020-0772-5 Erratum for: *Nat Methods*. 2020. Vol. 17, N. 3. P. 261–272. doi: 10.1038/s41592-019-0686-2
19. Neb.com [Internet]. Typical LAMP protocol (M0275). Доступ по ссылке: <https://www.neb.com/en/protocols/2014/11/21/typical-lamp-protocol-m0275> Дата обращения: 23.08.2024.
20. Paik I., Ngo P.H.T., Shroff R., et al. Improved Bst DNA polymerase variants derived via a machine learning approach // *Biochemistry*. 2023. Vol. 62, N. 2. P. 410–418. doi: 10.1021/acs.biochem.1c00451
21. Agustriana E., Nuryana I., Laksmi F.A., et al. Optimized expression of large fragment DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli* expression system // *Prep Biochem Biotechnol*. 2023. Vol. 53, N. 4. P. 384–393. doi: 10.1080/10826068.2022.2095573
22. Kiefer J.R., Mao C., Hansen C.J., et al. Crystal structure of a thermostable *Bacillus* DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution // *Structure*. 1997. Vol. 5, N. 1. P. 95–108. doi: 10.1016/s0969-2126(97)00169-x
23. Quyen T.L., Ngo T.A., Bang D.D., et al. Classification of multiple DNA dyes based on inhibition effects on real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Prospect for point of care setting // *Front Microbiol*. 2019. Vol. 10. P. 482561. doi: 10.3389/fmicb.2019.02234
24. Suwatthanarak T., Tanjak P., Chaiboonchoe A., et al. Overexpression of TSPAN8 in consensus molecular subtype 3 colorectal cancer // *Exp Mol Pathol*. 2024. Vol. 137. P. 104911. doi: 10.1016/j.yexmp.2024.104911
25. Yang J., Chen H., Wang Z., et al. Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of novel goose parvovirus // *Front Microbiol*. 2017. Vol. 8. P. 298309. doi: 10.3389/fmicb.2017.02472
26. Khan M., Li B., Jiang Y., et al. Evaluation of different PCR-based assays and LAMP method for rapid detection of *Phytophthora infestans* by targeting the Ypt1 gene // *Front Microbiol*. 2017. Vol. 8. P. 1920. doi: 10.3389/fmicb.2017.01920
27. Cao Z., Zhang K., Yin D., et al. Clinical validation of visual LAMP and qLAMP assays for the rapid detection of *Toxoplasma gondii* // *Front Cell Infect Microbiol*. 2022. Vol. 12. P. 1024690. doi: 10.3389/fcimb.2022.1024690
28. Svec D., Tichopad A., Novosadova V., et al. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments // *Biomol Detect Quantif*. 2015. Vol. 3. P. 9–16. doi: 10.1016/j.bdq.2015.01.005

REFERENCES

1. Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK. HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:796991. doi: 10.3389/fbioe.2021.796991
2. Demiriden SF, Kimiz-Gebologlu I, Oncel SS. Animal cell lines as expression platforms in viral vaccine production: A post Covid-19 perspective. *ACS Omega*. 2024;9(15):16904–16926. doi: 10.1021/acsomega.3c10484
3. Merten OW. Development of stable packaging and producer cell lines for the production of AAV vectors. *Microorganisms*. 2024;12(2):384. doi: 10.3390/microorganisms12020384
4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63
5. Naddaf R, Ben-Assa N, Gefen T, et al. A protocol for simple, rapid, and direct detection of SARS-CoV-2 from clinical samples, using reverse transcribed loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Bio Protoc*. 2020;10(20):e3789. doi: 10.21769/BioProtoc.3789
6. Park GS, Baek SH, Ku K, et al. Colorimetric RT-LAMP methods to detect severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Bio Protoc*. 2020;10(21):e3804. doi: 10.21769/BioProtoc.3804
7. Anahar MN, Mcgrath GEG, Rabe BA, et al. Clinical assessment and validation of a rapid and sensitive SARS-CoV-2 test using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification without the need for RNA extraction. *Open Forum Infect Dis*. 2020;8(2):ofaa631. doi: 10.1093/ofid/ofaa631

8. Takayama I, Nakauchi M, Takahashi H, et al. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus. *J Virol Methods*. 2019;267:53–58. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.02.010
9. Huang X, Tang G, Ismail N, Wang X. Developing RT-LAMP assays for rapid diagnosis of SARS-CoV-2 in saliva. *EBioMedicine*. 2022;75:103736. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103736
10. Thiessen LD, Neill TM, Mahaffee WF. Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the field detection of *Erysiphe necator*. *PeerJ*. 2018;6:e4639. doi: 10.7717/peerj.4639
11. Jiang L, Lan X, Ren L, et al. Design of a digital LAMP detection platform based on droplet microfluidic technology. *Micromachines*. 2023;14(5):1077. doi: 10.3390/mi14051077
12. Lin X, Huang X, Urmann K, et al. Digital loop-mediated isothermal amplification on a commercial membrane. *ACS Sens*. 2019;4(1):242–249. doi: 10.1021/acssensors.8b01419
13. Bobrovsky PA, Grafkskaia EN, Kharlampieva DD, et al. Specific activation of growth factors gene expression in the Expi293F human cell line using CRISPR/Cas9-SAM technology leads to increased proliferation. *Acta Naturae*. 2024;16(3):25–37. EDN: AKHHBB doi: 10.32607/actanaturae.27415
14. Ong J, Evans TC, Tanner N, inventors; New England Biolabs Inc., assignee. *DNA polymerases*. United States patent US 8993298B1. 2015.
15. Primerexplorer.jp [Internet]. LAMP primer designing software PrimerExplorer V5 [cited 2024 Aug 23]. Available from: <https://primerexplorer.jp/e/>
16. Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statist*. 1947;18(1):50–60. doi: 10.1214/aoms/1177730491
17. Mcknight P, Najab J. Mann-Whitney U Test. In: Weiner IB, Craighead WE, editors. *The Corsini encyclopedia of psychology (4th edition)*. John Wiley; 2010. doi: 10.1002/9780470479216.corpsy0524
18. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods*. 2020 Mar;17(3):352. doi: 10.1038/s41592-020-0772-5 Erratum for: *Nat Methods*. 2020;17(3):261–272. doi: 10.1038/s41592-019-0686-2
19. Neb.com [Internet]. Typical LAMP protocol (M0275) [cited 2024 Aug 23]. Available from: <https://www.neb.com/en/protocols/2014/11/21/typical-lamp-protocol-m0275>
20. Paik I, Ngo PHT, Shroff R, et al. Improved Bst DNA polymerase variants derived via a machine learning approach. *Biochemistry*. 2023;62(2):410–418. doi: 10.1021/acs.biochem.1c00451
21. Agustriana E, Nuryana I, Laksmi FA, et al. Optimized expression of large fragment DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli* expression system. *Prep Biochem Biotechnol*. 2023;53(4):384–393. doi: 10.1080/10826068.2022.2095573
22. Kiefer JR, Mao C, Hansen CJ, et al. Crystal structure of a thermostable *Bacillus* DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution. *Structure*. 1997;5(1):95–108. doi: 10.1016/s0969-2126(97)00169-x
23. Quyen TL, Ngo TA, Bang DD, et al. Classification of multiple DNA dyes based on inhibition effects on real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Prospect for point of care setting. *Front Microbiol*. 2019;10:482561. doi: 10.3389/fmicb.2019.02234
24. Suwatthanarak T, Tanjak P, Chaiboonchoe A, et al. Overexpression of TSPAN8 in consensus molecular subtype 3 colorectal cancer. *Exp Mol Pathol*. 2024;137:104911. doi: 10.1016/j.yexmp.2024.104911
25. Yang J, Chen H, Wang Z, et al. Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of novel goose parvovirus. *Front Microbiol*. 2017;8:298309. doi: 10.3389/fmicb.2017.02472
26. Khan M, Li B, Jiang Y, et al. Evaluation of different PCR-based assays and LAMP method for rapid detection of *Phytophthora infestans* by targeting the *Ypt1* gene. *Front Microbiol*. 2017;8:1920. doi: 10.3389/fmicb.2017.01920
27. Cao Z, Zhang K, Yin D, et al. Clinical validation of visual LAMP and qLAMP assays for the rapid detection of *Toxoplasma gondii*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:1024690. doi: 10.3389/fcimb.2022.1024690
28. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, et al. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*. 2015;3:9–16. doi: 10.1016/j.bdq.2015.01.005

ОБ АВТОРАХ

* **Бобровский Павел Александрович**, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а;
ORCID: 0000-0001-5735-0042;
eLibrary SPIN: 7535-8723;
e-mail: pbobrovskiy@gmail.com

Графская Екатерина Николаевна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0001-8957-6142;
eLibrary SPIN: 1821-2746;
e-mail: grafskayacath@gmail.com

Харлампиева Дарья Дмитриевна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-3514-2303;
eLibrary SPIN: 5661-5451;
e-mail: harlampieva_d@mail.ru

AUTHORS' INFO

* **Pavel A. Bobrovsky**, Cand. Sci. (Biology);
address: 1a Malaya Pirogovskaya street, 119435 Moscow, Russia;
ORCID: 0000-0001-5735-0042;
eLibrary SPIN: 7535-8723;
e-mail: pbobrovskiy@gmail.com

Ekaterina N. Grafkskaia, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0001-8957-6142;
eLibrary SPIN: 1821-2746;
e-mail: grafskayacath@gmail.com

Daria D. Kharlampieva, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-3514-2303;
eLibrary SPIN: 5661-5451;
e-mail: harlampieva_d@mail.ru

Фисунов Глеб Юрьевич, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-6302-8305;
eLibrary SPIN: 5133-4223;
e-mail: g.fisunov@sysbiomed.ru

Манувера Валентин Александрович, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-2471-0563;
eLibrary SPIN: 9010-4521;
e-mail: vmanuvera@yandex.ru

Лазарев Василий Николаевич, д-р биол. наук;
ORCID: 0000-0003-0042-966X;
eLibrary SPIN: 1578-8932;
e-mail: lazar0@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Gleb Yu. Fisunov, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-6302-8305;
eLibrary SPIN: 5133-4223;
e-mail: g.fisunov@sysbiomed.ru

Valentin A. Manuvera, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-2471-0563;
eLibrary SPIN: 9010-4521;
e-mail: vmanuvera@yandex.ru

Vassili N. Lazarev, Dr. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-0042-966X;
eLibrary SPIN: 1578-8932;
e-mail: lazar0@mail.ru