

УДК 579.69

АНАЛИЗ ВЕРОЯТНОСТИ ЗАРАЖЕНИЯ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ФРАГМЕНТАМИ ДНК В ПРИРОДЕ НА ПРИМЕРЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ СОИ ЛИНИИ GTS40-3-2

Журба Р. Г.

ГП «Крымстандартметрология», Симферополь, ruskend@mail.ru

В данной работе представлен анализ вероятности заражения кишечной палочки генетически модифицированными фрагментами ДНК сои линии GTS40-3-2. Анализ термической устойчивости показал, что даже длительное прогревание при температуре 96°C не приводит к значительному разрушению ГМ фрагментов. Анализ кала крысы, вскармливаемой ГМ соей, на наличие ГМ последовательностей дал отрицательный результат. Таким образом, химическая обработка пищеварительной системы практически полностью разрушает встроенные последовательности и оснований утверждать, что в природе кишечная палочка будет контактировать с ГМ ДНК в организме млекопитающих, нет.

Ключевые слова: генетически модифицированные растения.

ВВЕДЕНИЕ

В Картахенском протоколе по биобезопасности к конвенции о биологическом разнообразии говорится, что получение живых измененных организмов, их обработка, транспортировка, использование, передача и высвобождение должны осуществляться таким образом, чтобы не допускались или были уменьшены риски для биологического разнообразия, с учетом также рисков для здоровья человека [1].

В 1996 году были произведены первые масштабные посевы ГМ-растений, а по данным 2007 г. общая площадь посевов уже составила 80 млн. га [2]. Ввиду существующих потенциальных рисков, связанных с ГМО, в Украине, начиная с 2004 года, был издан ряд нормативных документов, регулирующих оборот ГМ-культур в государстве, таких как:

– Указ Президента № 672 от 23.06.2004 г. «О межведомственной комиссии по вопросам биологической и генетической безопасности при Совете национальной безопасности и обороны Украины»;

– Закон Украины №1103 от 31.05.2007 г. «О государственной системе биобезопасности при обороте генетически модифицированных организмов»;

– Постановление КМУ № 734 от 20.08.2008 г. «Об утверждении порядка выдачи разрешения на ввоз незарегистрированных ГМО для научных целей»;

– Постановление КМУ № 468 от 13 мая 2009 г. «Об утверждении порядка этикетирования пищевых продуктов, которые содержат генетически модифицированные организмы или изготовлены с их использованием и вводятся в оборот»;

– Приказ МОЗ № 971 от 09.11.2010 г. «Про утверждение Перечня пищевых продуктов, для которых осуществляется контроль содержания ГМО», и некоторые другие.

Один из потенциальных рисков, связанных с ГМО – передача генов другим видам, поэтому необходимо проводить исследования по определению генетической стабильности ГМ-культур и их генетическое взаимодействие с другими организмами в природных экологических системах [2].

Ранее нами было установлено, что кишечная палочка может накапливать ГМ ДНК на протяжении нескольких поколений [3].

Так как кишечная палочка может накапливать ГМ ДНК, то был проведен ряд экспериментов, чтобы проверить вероятность попадания ГМ ДНК к кишечной палочке в природе. Была исследована термическая устойчивость ГМ последовательностей и их устойчивость при прохождении через желудочно-кишечный тракт теплокровного животного.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Описание сои линии GTS 40-3-2. Линия сои GTS 40-3-2 была произведена компанией «Monsanto Canada Inc.». Основным требованием при создании данной линии являлась устойчивость к действию гербицидов, используемых для борьбы с сорными растениями. Производство сои GTS 40-3-2 основано на технологии рекомбинантных ДНК посредством вставки глифосат-устойчивой формы гена, фермента 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphate synthase (EPSPS). Глифосат-устойчивая форма гена EPSPS была выделена из штамма CP4 бактерии *Agrobacterium tumifaciens* и при помощи биолистического метода введена в геном линии сои A5403 [4].

Глифосат – это основной ингредиент гербицида Roundup, который широко используется во всем мире для борьбы с сорняками. Глифосат действует как конкурирующий ингибитор важнейшего фермента EPSPS, который вовлечен в биохимические пути синтеза таких ароматических аминокислот как фенилаланин, тирозин и триптофан. Ингибирование EPSPS приводит к подавлению роста растения и последующей гибели. Бактериальная же форма этого фермента нечувствительна к глифосату с одной стороны, а с другой – может быть использована при синтезе ароматических аминокислот в растениях. В сое GTS 40-3-2 находится под контролем сильного конститутивного промотора, выделенного из вируса мозаики цветной капусты (CaMV E35S) и терминатора нопалин-синтазы (T-nos), выделенного из *A. tumifaciens* [4].

Последовательность СТР4, выделенная из *Petunia hybrida*, расположенная слева от 5' конца гена CP4EPSPS, кодирует хлоропласт-транзитный пептид (Chloroplast Transit Peptide), при помощи которого вновь синтезированный фермент (EPSPS) импортируется в хлоропласты [5].

Стабильность интегрированного участка в растительном геноме. Литературные данные свидетельствуют о том, что линия GTS 40-3-2 содержит единственную функциональную экспрессионную кассету, содержащую промотор CaMV E35S, последовательность, кодирующую хлоропласт-транзитный пептид,

последовательность, кодирующую CP4EPSPS и сигнал полиаденилирования pos (T-nos). Других составляющих плазмидного вектора, кроме экспрессионной кассеты, описанной выше, обнаружено не было. Последующие генерации описанной линии сои не обнаружили дальнейших сегрегаций встроенных генов, что свидетельствует о том, что линия GTS 40-3-2-гомозиготная по встроенному гену. Однако более подробная характеристика данной линии показала, что в ее геноме все же имеются две небольшие нефункциональные последовательности, свойственные плазмидному вектору PV-GMGT04 размером 250 и 72 пары оснований [5].

Методика экспериментов. В ходе эксперимента контрольный образец генетически модифицированной ДНК сои линии GTS40-3-2 прогревали в термостате при температуре 96°C на протяжении 7 часов. Затем изначальный (контроль) и опытный образцы были проанализированы методом ПЦР анализа на наличие генетически модифицированных фрагментов промотора p35S и терминатора tNOS.

Лабораторную крысу на протяжении недели вскармливали ГМ растением. В качестве корма использовались 100% бобы сои линии GTS40-3-2. Кормление производилось 2 раза в сутки по 100 грамм корма. После каждого кормления клетка очищалась от остатков корма, чтобы избежать контаминации. На 3й и 7й день были отобраны образцы кала и проведен анализ на наличие ГМ последовательностей: промотора p35S и терминатора tNOS, которые присутствуют в сое линии GTS40-3-2.

Выделение ДНК. Выделение ДНК проводилось с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-С».

Анализ на наличие последовательностей. Испытания на наличие последовательностей проводились тест-системамой производства ЗАО «Синтол»: «Растение/35S/NOS скрининг».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным А.В. Филиппского при 200°C наступала необратимая деструкция всех исследованных им образцов, связанная с разрушением D-рибозы [6]. В результате проведенного опыта по температурной устойчивости модифицированной ДНК циклы обнаружения генетически модифицированных участков экспериментальной и контрольной групп отличались не более чем на одну единицу. Это свидетельствует о снижении первоначального количества ДНК не более чем в 2 раза. [7] Это объясняется тем, что при 96°C идет лишь расхождение цепочек молекулы ДНК (денатурация), что является обратимым процессом, [8] а разрушение не значительно. Таким образом, при перепадах температур, близких к параметрам термической обработки пищи, значительного разрушения генетически модифицированных фрагментов не происходит. Следовательно, термическая обработка не может предотвратить попадание генетически модифицированного материала в пищевой тракт организма.

На следующем этапе работы исследовали возможность прохождения генетически модифицированного материала через пищеварительный тракт организма лабораторной мыши. Наличие модифицированной ДНК в экскрементах

животного свидетельствовало бы о том, что данный генетический материал имеет возможность взаимодействовать с кишечной палочкой. Результаты ПЦР анализа приведены в таблице 1.

Таблица 1

Анализ кала крысы на наличие последовательностей промотора p35S и терминатора tNOS, собранного на 3-й и 7-й день эксперимента

Образец	Цикл обнаружения последовательности хлорофилла (наличие растительной ДНК)		Цикл обнаружения последовательности p35S		Цикл обнаружения последовательности tNOS		Внутренний положительный контроль (наличие ингибиторов ПЦР)	
	Цикл	Результат	Цикл	Результат	Цикл	Результат	Цикл	Результат
К+	23,45	+	32,95	+	33,76	+	29,57	+
К+	24,75	+	32,07	+	32,82	+	28,64	+
К-	NEG	-	NEG	-	NEG	-	28,49	+
К-	NEG	-	NEG	-	NEG	-	28,96	+
3 день	37,93	-	NEG	-	NEG	-	29,47	+
3 день	39,78	-	NEG	-	NEG	-	29,14	+
7 день	NEG	-	NEG	-	38,61	-	29,30	+
7 день	NEG	-	NEG	-	NEG	-	28,57	+
ОКО	NEG	-	NEG	-	NEG	-	28,87	+
ОКО	NEG	-	NEG	-	NEG	-	28,42	+

Примечание к таблице. К+ – положительный контроль. К- – отрицательный контроль амплификации. ОКО – отрицательный контроль выделения.

По результатам ПЦР анализа ГМ последовательности были обнаружены только за 37 циклом, что означает наличие лишь единичных фрагментов в образце. Согласно ДСТУ ISO 21569 такое попадание фрагментов считается случайным, и образец считается отрицательным.

Разрушение ДНК в организме крысы в основном происходит за счет дезоксирибонуклеаз, входящих в состав панкреатического сока. [9] Таким образом, химическая обработка пищеварительной системы практически полностью разрушает встроенные последовательности и оснований утверждать, что в природе кишечная палочка будет контактировать с ГМ ДНК в организме млекопитающих, нет.

ВЫВОДЫ

1. Термическое разрушение фрагментов ГМ ДНК в природе незначительно.
2. Генетически модифицированная ДНК может долго храниться в обычных природных условиях, но практически полностью нейтрализуется пищеварительной системой млекопитающих.

Список литературы

1. Картахенский протокол по биобезопасности к конвенции о биологическом разнообразии от 29 февраля 2000 г., статья 2, п. 2. 2. М., «Роспотребстандарт», 2000.
2. Игнатъев И. Генетически модифицированные организмы и обеспечение биологической безопасности / И. Игнатъев, И. Тромбицкий, А. Лозан. – Кишнев: Экоспектр-Бендеры, 2007. – 60 с.
3. Журба Р. Г. Влияние ДНК генномодифицированных сои GTS 40-3-2 и кукурузы MON810 на штаммы кишечной палочки *E. Coli* O-55 и M-17 / Р. Г. Журба, А. Г. Журба, А. П. Симчук // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2010. – Т. 23 (62), №4. – С. 89–94.
4. Журнал «Испытания, измерения, анализ» №10 2004. Генетически модифицированные источники: характеристика некоторых ГМ-линий их детекция.
5. Ашмарин И. И. Практическая медицинская микробиология. (Руководство). / И. И. Ашмарин. – 2-е изд. испр. и доп. – Т.: «Медицина», 1966. – 324 с.
6. Филипский А. В. Механизм термического разрушения нуклеиновых кислот. / А. В. Филипский // Біофізичний вісник. – Вип. 22 (1). 2009. – С 98 – 102.
7. ПЦР «в реальном времени» / [Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов и др.]. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
8. Шабарова З. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. / З. А. Шабарова, А. А. Богданов. – Москва: Химия, 1978. – 584 с.
9. Агаджанян Н. А. Основы физиологии человека: Учебник для студентов вузов, обучающихся по медицинским и биологическим специальностям / Н. А. Агаджанян, В. И. Торшин, В. М. Власова. – 2-е издание, исправленное. – М.: РУДН, 2001. – 408 с.

Журба Р. Г. Аналіз імовірності зараження кишкової палички генетично модифікованими фрагментами ДНК в природі на зразку генетично модифікованої сої лінії GTS40-3-2 // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2012. Вип. 6. С. 264–268.

В даній роботі представлений аналіз імовірності зараження кишкової палички генетично модифікованими фрагментами ДНК сої лінії GTS40-3-2. Аналіз термічної стійкості показав, що навіть тривале прогрівання при температурі 96°C не призводить к значному руйнуванню ГМ фрагментів. Аналіз калу пацюка, якого годували ГМ соєю, на наявність ГМ послідовностей дав негативний результат.

Ключові слова: генетично модифіковані рослини.

Zhurba R. G. Probability analysis of the infection of colibacillus by the genetically modified DNA fragments for the example of soya bean GTS40-3-2 // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2012. Iss. 6. P. 264–268.

This article the probability analysis of the infection of *Escherichia coli* by the genetically modified DNA fragments of soya bean GTS40-3-2 was presented. Analysis of thermal stability showed that even long heating with temperature 96°C doesn't lead to serious destruction of those fragments. Analysis of excrements of the rat that was fed up by genetically modified soya beans for the presence of genetically modified fragments showed negative result.

Key words: genetically modified plants.

Поступила в редакцію 21.06.2012 г.