

Л.В. Король,
С.О. Гончарова,
О.В. Піскова,
А.В. Костенко,
І.І. Коровко

Український інститут експертизи
сортів рослин

Л.М. Кожемякіна

Інститут біоенергетичних культур
і цукрових буряків НААН

УДК 604.6:631.53.01:633.854.79(477-25)

Особливості виявлення генетично модифікованих організмів у насінних партиях ріпака (*Brassica napus* L.)

Наведено результати молекулярно-біологічних досліджень з апробації та оцінки мультиплексних тест-систем для ідентифікації генетично модифікованих організмів (ГМО) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Для виявлення генетичних модифікацій у рослинах родини хрестоцвітних (*Brassicaceae*) недостатнім є скринінг основних регуляторних послідовностей, оскільки в генно-інженерних маніпуляціях використовується 35S промотор ДНК-умісного вірусу мозаїки цвітної капусти (*CaMV*), наявність якого в досліджуваному матеріалі може призвести до отримання хибно позитивних результатів. Досліджено доцільність тесту на наявність ДНК-вірусу *CaMV* та аналізу скринінгових послідовностей генів інтересу для їхнього використання під час аналізу досліджуваних зразків насіння ріпака (*Brassica napus* L.).

Встановлено, що аналіз наявності / відсутності *CaMV* за позитивного результату по 35S промотору не дає вичерпної відповіді стосовно відсутності ГМО у досліджуваному зразку. Обґрунтовано доцільність скринінгу ГМО у насінному матеріалі ріпака проводити за NOS термінатором і генами інтересу.

Ключові слова:

ріпак, ГМО, скринінгові послідовності ГМО, ПЛР у реальному часі, вірус мозаїки цвітної капусти (*CaMV*).

Вступ. В умовах значного поширення біотехнологічних культур необхідним є контроль наявності генетично модифікованих організмів (ГМО) серед насінного матеріалу, оскільки виникає ризик забруднення посівів сільськогосподарських культур, отриманих з використанням як класичних методів селекції, так і генної інженерії [1]. Зокрема це стосується перекреснозапильних культур таких, як кукурудза та ріпак.

Ріпак є основною олійною культурою у багатьох країнах світу, яка на сьогодні посідає третє місце після сої культурної

та бавовнику і друге за валовим виробництвом олії. Селекція ріпака ведеться за двома основними напрямками: зниження вмісту глюकोзинолатів, оптимізація співвідношення жирних кислот і підвищення вмісту ерукової або лауринової кислот [2]. З розвитком технологій генної інженерії були створені сорти ріпака, що характеризуються стійкістю проти гербіцидів широкого спектра дії, шкідників та пониженої температури, мають модифікований жирнокислотний склад олії, здатність до продукування фармакологічних білків та си-

ровини для виробництва біодеградуючих полімерів, а також несуть ознаку чоловічої стерильності. Зі створенням таких культур виникла необхідність у розробці методів для їхнього скринінгу.

Загальноприйнята схема виявлення й ідентифікації ГМО включає наступні етапи: 1) первинний скринінг насінного матеріалу, 2) аналіз наявності зареєстрованих ГМО, 3) кількісне визначення ГМО. Як скринінгові послідовності ГМО зазвичай використовують 35S промотор та NOS термінатор *Agrobacterium tumefaciens*,

оскільки вони входять до складу більш ніж 80% ГМО [3, 4]. Однак скринінг за 35S промотором не підходить для ріпака, оскільки цей промотор взято з ДНК-умісного вірусу мозаїки цвітної капусти (*Cauliflower mosaic virus – CaMV*), який має здатність уражувати представників родини хрестоцвітих. Отже, під час проведення досліджень на вміст ГМО у зразках ріпака надзвичайно великий ризик отримання хибних позитивних результатів. Мінімізувати ризик можна двома шляхами: або не використовувати у тесті 35S промотор CaMV, або для позитивних за цим промотором зразків використовувати додатковий тест на наявність ДНК-вірусу CaMV.

Метою нашої роботи було дослідити доцільність тесту на наявність ДНК-вірусу CaMV та проаналізувати інші послідовності для використання їх як скринінгові, під час аналізу насінних зразків ріпака.

Методи досліджень. В Україні затверджено ряд нормативних документів і методик, що забезпечують проведення досліджень з виявлення та ідентифікації ГМО. Зокрема розроблено державні стандарти України для етапів відбору проб, виділення ДНК, скринінгу ГМО [5, 6, 7, 8]. За ідентифікації ГМО у рослинному матеріалі виділяють наступні етапи:

- виділення ДНК з досліджуваного зразка;
- скринінг на наявність ГМО;
- перевірка позитивних за 35S промотором і NOS термінатором зразків на наявність CaMV і *A. tumefaciens*;
- ідентифікація ГМО.

Виділення ДНК. Першим етапом аналізу на наявність ГМО у рослинному матеріалі з допомогою ПЛР є виді-

лення ДНК. Для отримання високоочищеної нуклеїнової кислоти, що не містить інгібуючих домішок, необхідно використовувати найоптимальніші методи [1]. Для виділення ДНК з насіння ріпака відбирали 1000 насінин й розмелювали на муку. Для подальших маніпуляцій використовували по 100 мг зразка. Виділення ДНК проводили з використанням катіонного детергенту бромід цетилтриметиламонію (*cetyltrimethylammonium bromide, ЦТАБ*) із сорбентом [6, 8]. Для отриманих зразків ДНК визначали концентрацію та ступінь очистки на спектрофотометрі, використовуючи ТЕ-буфер для калібрування.

Скринінг генетично модифікованих організмів. З метою виявлення ГМО у зразках ріпака використовується три мультиплексні тест-системи.

Перша містила праймери та флуоресцентні зонди для виявлення специфічного гена рослин, 35S промотору та NOS термінатора («Растение / 35S / NOS скринінг», Синтол, Російська Федерація). Дана тест-система призначена для виявлення ГМО рослинного походження у продуктах харчування, сировині та кормах для тварин методом ПЛР у реальному часі та рекомендована для використання при аналізі будь-яких зразків, зокрема і багатокомпонентних, дає змогу встановити наявність можливих ліній ГМО без їх ідентифікації.

Друга тест-система містила праймери та флуоресцентні зонди для виявлення специфічного гена рослин та CaMV («АмплісенСенс® *CamV-FL*», АмплісенСенс®, Російська Федерація). Набір реагентів, призначений для виявлення ДНК

CaMV у продуктах харчування і кормах, методом ПЛР з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією. Використання даного тестового набору сприяє отриманню інформації про походження ДНК 35S промотору, що наявний у зразку, який може бути як вірусним, так і трансгенним.

Тест-система «ГМО рапс скринінг» (Синтол, Російська Федерація) містить праймери до структурного гена ріпака *CruA*, NOS термінатора, генів фосфінотрицин N-ацетилтрансферази із *Streptomyces viridochromogenes (Pat)* та 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтетази (*cp4 EPSPs*), використовується для ідентифікації генетичних модифікацій ріпака шляхом визначення характерних послідовностей ДНК-методом ПЛР у реальному часі й рекомендована виробником для аналізу рослин або насіння ріпака. Аналіз визначає більшість з комерційно зареєстрованих ліній ріпака без їхньої детальної ідентифікації.

Перша та друга тест-системи передбачають використання внутрішнього контролю реакції, що дає можливість виявити присутність речовин, які інгібують реакцію для третьої тест-системи, контроль можна здійснити за специфічним геном рослин. ПЛР проводили згідно з інструкцією виробників в ампліфікаторі *iQ™5 Optical Module (Bio-Rad, США)*, включаючи негативний контроль виділення ДНК з наступними параметрами (табл.).

Результати досліджень. У процесі роботи проаналізовано кожен етап ідентифікації ГМО в насінному матеріалі. Для отриманих препаратів ДНК з використанням ЦТАБ-методу

Таблиця
Параметри ампліфікації зразків ріпака

Назва тест-системи	Початкова денатурація	Денатурація	Гібридизація праймерів та детекція продуктів реакції	Кількість циклів
«Растение / 35S / NOS скрининг»	95°C, 5 хв.	95°C, 15 с	59°C, 40 с	45
«АмплісенсСенс® CamV-FL»	95°C, 15 хв.	95°C, 15 с	59°C, 60 с	42
«ГМ рапс скрининг»	95°C, 5 хв.	95°C, 15 с	61°C, 40 с	45

і сорбенту визначали ступінь очистки та концентрацію на спектрофотометрі, використовуючи ТЕ-буфер з метою калібрування. Концентрація ДНК, виділеної зі зразків насіння ріпака, знаходилась у межах 150–270 мг/мл, при цьому співвідношення A260/A280 було 1,7–1,8.

Реакцію ампліфікації здійснювали з використанням трьох різних комерційних наборів з метою виявлення ГМО у зразках ріпака та оцінки можливих ризиків за отримання хибно позитивних результатів.

Результатом ПЛР-аналізу у реальному часі є графік флуоресценції досліджуваних зразків і цифрові дані порівняння графіків накопичення ДНК. У результаті проведених досліджень виявлено, що для зразків насіння ріпака характерна наявність сигналу за флуоресцентною пробою 35S промотору. Стосовно до схеми проведення аналізів на вміст ГМО в рослинному матеріалі, наступним кроком є аналіз на наявність *CaMV*, причому за умови виявлення ДНК *CaMV* досліджувані зразки розцінюються як негативні. Однак, на наш погляд, така схема аналізу не є достатньою, оскільки результати якісного аналізу будуть однаковими для зразків, що містять лише *CaMV*, і для зразків, що містять гене-

тично модифіковані організми і *CaMV*. Так було досліджено зразки ріпака, що мали позитивний сигнал лише по 35S промотору на вміст *CaMV* (рис. 1). Зразки, для яких не виявлено позитивного сигналу по *CaMV*, розцінювались як такі, що містять ГМО та в подальших дослідженнях не використовувались.

У тест-системі, з використанням якої отримані дані результати, барвником *JOE* промарковано зонд до структурного гена ріпака, а барвником *ROX* – зонд до послідовності *CaMV*.

Аналіз позитивних за *CaMV* зразків на наявність гена енолпірувілшикіматфосфатсинтази (*EPSPs*) та фосфінотрицині N-ацетилтрансферази (*Pat*) показав присутність у частини зразків послідовностей *EPSPs*-гена (рис. 3). Значення порогового циклу реакції (*threshold cycle* – *Ct*) для трьох зразків рі-

пака за барвниками *FAM* (карбоксіфлуоресцеїн), *HEX* (6-карбоксіродамін), *ROX*, *Sy5* наведено на рис. 2.

На рис. 2. відображено процес накопичення цільових фрагментів структурного гена ріпака *CruA*, *NOS* термінатора, *Pat* гена та *EPSPs* гена, а також порогові лінії для флуоресцентних барвників, відповідно яким встановлено значення *C_t*.

Отримані дані свідчать про присутність послідовностей ДНК *NOS* термінатора у зразках №443 і №444 (порогові цикли за барвником *FAM* – 27 та 33) та *EPSPs* гена у цих же зразках (пороговий цикл за барвником *Sy5* – 38). За барвником *HEX*, що вказує на наявність структурного гена ріпака *CruA*, отримано позитивний результат по всіх зразках.

Висновки. 1. Скринінг насінного матеріалу рослин, що відносяться до родини хрестоцвітих (*Brassicaceae*) доцільно проводити за *NOS* термінатором та генами інтересу. Аналіз наявності/відсутності *CaMV* не дає вичерпної відповіді стосовно до відсутності ГМО у зразку.

2. У подальшій роботі для аналізу зразків насіння родини хрестоцвітих (*Brassicaceae*) на вміст ГМО слід рекоменду-

Well	Fluor	Type	Identifier	Replicate #	Threshold Cycle (Ct)	Ct Mean	Ct Std. Dev
B04	JOE	Unkn	N974pinak (35S+)	2	14,40	14,40	N/A
B06	JOE	Unkn	N975pinak (35S+)	3	17,10	17,10	N/A
B08	JOE	Unkn	N976pinak (35S+)	4	14,10	14,10	N/A
B11	JOE	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A
D02	JOE	Unkn	N979 pinak (35S+)	5	14,05	14,05	N/A
D04	JOE	Unkn	N980pinak (35S+)	6	15,17	15,17	N/A
G11	JOE	Pos Ctrl	ПК+	1	27,26	27,26	N/A
B04	ROX	Unkn	N974pinak (35S+)	2	25,86	25,86	N/A
B06	ROX	Unkn	N975pinak (35S+)	3	31,31	31,31	N/A
B08	ROX	Unkn	N976pinak (35S+)	4	28,23	28,23	N/A
B11	ROX	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A
D02	ROX	Unkn	N979 pinak (35S+)	5	28,44	28,44	N/A
D04	ROX	Unkn	N980pinak (35S+)	6	27,98	27,98	N/A
G11	ROX	Pos Ctrl	ПК+	1	28,70	28,70	N/A

Рис. 1. Результати перевірки п'яти зразків ріпака на наявність *CaMV*

Особливості виявлення генетично модифікованих організмів у насінних партіях ріпака (*Brassica napus* L.)

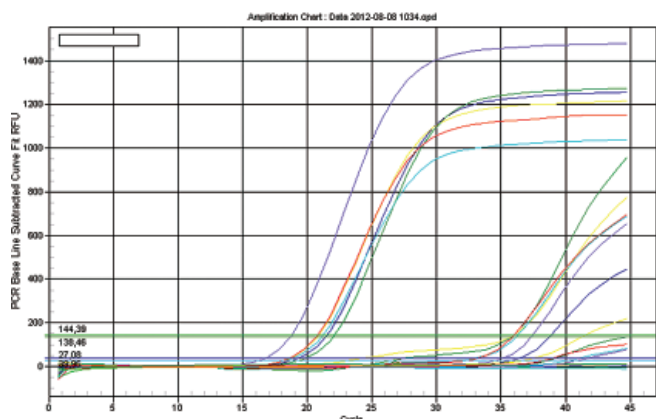


Рис. 2. Графік накопичення ДНК для зразків ріпака

Well	Fluor	Type	Identifier	Replicate #	Threshold Cycle (Ct)	Ct Mean	Ct Std. Dev	Set Point
B02	FAM	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B05	FAM	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B08	FAM	Pos Ctrl	ГК	1	27,93	28,05	0,170	N/A
D02	FAM	Unkn	ріпак 442	1	N/A	35,85	0,895	N/A
D06	FAM	Unkn	ріпак 443	2	27,76	26,13	2,512	N/A
D08	FAM	Unkn	ріпак 444	3	33,18	33,24	0,085	N/A
B02	HEX	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B05	HEX	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B08	HEX	Pos Ctrl	ГК	1	33,32	33,62	0,425	N/A
D02	HEX	Unkn	ріпак 442	1	21,04	19,68	1,918	N/A
D06	HEX	Unkn	ріпак 443	2	21,64	21,02	0,888	N/A
D08	HEX	Unkn	ріпак 444	3	20,76	20,54	0,323	N/A
B02	ROX	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B05	ROX	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B08	ROX	Pos Ctrl	ГК	1	28,69	28,93	0,336	N/A
D03	ROX	Unkn	ріпак 442	1	N/A	00,00	N/A	N/A
D05	ROX	Unkn	ріпак 443	2	N/A	00,00	N/A	N/A
D09	ROX	Unkn	ріпак 444	3	N/A	00,00	N/A	N/A
B02	Cy5	NTC	OKB	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B05	Cy5	Neg Ctrl	OK	1	N/A	00,00	N/A	N/A
B08	Cy5	Pos Ctrl	ГК	1	27,36	27,64	0,397	N/A
D02	Cy5	Unkn	ріпак 442	1	N/A	00,00	N/A	N/A
D06	Cy5	Unkn	ріпак 443	2	38,37	37,45	1,313	N/A
D09	Cy5	Unkn	ріпак 444	3	38,02	38,99	1,374	N/A

Рис. 3. Результати скринінгу трьох зразків ріпака на наявність ГМО*

* Примітка: червоним кольором позначено позиції, що свідчать про наявність цільових послідовностей генетично модифікованих організмів.

вати дві мультиплексні тест-системи для проведення ПЛР у реальному часі. Одна з яких має включати праймери та флуоресцентні зонди для виявлення специфічного гена рослин, 35S промотору та NOS термінатора. При наявності позитивного сигналу на 35S промотор необхідно про-

довжити аналіз даних зразків на виявлення генів інтересу, що забезпечують стійкість рослин до найбільш розповсюджених гербіцидів широкого спектра дії. Це завдання вирішується шляхом використання тест-системи, що включає праймери та флуоресцентні зонди для виявлення

структурного гена ріпака *CruA*, *NOS* термінатора, *Pat* гена та *EPSPs* гена. Запропонована схема проведення досліджень дає змогу швидко й з невеликими витратами отримати достовірні дані скринінгу ГМО ріпака, що містить вказані гени, та виключити можливість отримання хибно позитивних результатів.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Сорочинський Б.В. Генетично модифіковані рослини / Б.В.Сорочинський, О.О. Данильченко, Г.В. Кріпка. – К.: Фітосоціоцентр, 2005. – 204 с.
2. Ситнік І.Д. Озимий та ярий ріпак / І.Д. Ситнік, О.Л. Кляченко, О.Г. Какорін. – К.: Знання України, 2005. – 115 с.
3. Блюм Я.Б. Впровадження методів оцінки наявності та вмісту генетично модифікованих компонентів у продуктах харчування, кормах і парфумерно-косметичних виробках / Я.Б. Блюм, М.О. Банникова, П.А. Карпов [та інші] // Наука та інновації. – 2008. – Т. 4, № 2. – С. 40–48.
4. Епринцев А.П. Идентификация и исследование экспрессии генов / А.П. Епринцев, В.Н. Попов, Д.Н. Федорин. – Воронеж, 2008. – 64 с.
5. ДСТУ ISO 21569:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Якісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти (ISO 21569:2005, IDT): – Чинний від 2010-01-01 – К.: Держспоживстандарт України, 2009. – 50 с.
6. ДСТУ-П SEN/TS 15568:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Відбирання проб (SEN/TS 15568:2006, IDT) – Чинний від 2010-01-01 – К.: Держспоживстандарт України, 2009. – 10 с.
7. ДСТУ ISO 21570:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Кількісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти (ISO 21570:2005, IDT) – Чинний від 2009-07-01 – К.: Держспоживстандарт України, 2009. – 83 с.
8. ДСТУ ISO 21571:2008. Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Екстрагування нуклеїнової кислоти (ISO 21571:2005, IDT) – Чинний від 2009-07-01 – К.: Держспоживстандарт України, 2009. – 83 с.