

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ НАБОРА ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ПЦР-РВ
АНАЛИЗА РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ (ПРОМОТОРА SsuAra И
ТЕРМИНАТОРА E9) ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ-
МОДИФИЦИРОВАННЫХ (ГМ) ЛИНИЙ РАПСА, СОИ, КАРТОФЕЛЯ
И ДРУГИХ РАСТЕНИЙ

Ю.С. АЛЯПКИНА¹, М.В. МОИСЕЕВА^{1,2}, О.В. КСЕНОФОНТОВА¹,
Я.И. АЛЕКСЕЕВ^{1,2}

(¹ ООО «Синтол»; ² Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии)

Разработана мультиплексная система для анализа методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) дополнительных регуляторных последовательностей, встраиваемых в геном ГМ растений – промотора SsuAra и терминатора E9, и оценки наличия растительной ДНК в исследуемых образцах. Показана 100% специфичность используемых праймеров и зондов при исследовании 28 ГМ линий 5 видов растений и 9 видов растений, наиболее часто встречающихся в продуктах питания и кормах, а также не ГМ-растений. Предел обнаружения регуляторных последовательностей при концентрации растительной ДНК 500 нг в пробе составил 0,01% ГМ линии, при концентрации растительной ДНК 5 нг в пробе – 0,1% ГМ линии, при концентрации 1 нг в пробе – 1% ГМ линии. Эффективность и чувствительность каждой из четырех реакций, входящих в мультиплексную систему, полностью совпадали с аналогичными характеристиками для моноплексных систем. На основе разработанной мультиплексной ПЦР-РВ системы валидирован набор реагентов «Растение/SsuAra/E9/ВПК». Эффективность ПЦР-РВ для разработанного набора реагентов составила более 95%. Подтверждена 100% повторяемость и воспроизводимость результатов анализа. Набор может быть использован для скрининг-анализа любых растений с целью обнаружения ДНК ГМО, особенно при исследовании таких видов растений как рапс, картофель, соя, хлопок, в геномах ГМ линий которых наиболее часто встречаются промотор SsuAra и терминатор E9.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ), анализ генетически модифицированных организмов, промотор SsuAra, терминатор E9.

Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) является наиболее специфичным и чувствительным методом, позволяющим обнаруживать генетически-модифицированные (ГМ) растения, точно идентифицировать конкретную ГМ линию и проводить количественный анализ процентного содержания конкретной ГМ линии относительно общего количества растительного компонента [1–4]. В настоящее время по данным Международного сервиса по сбору агро-биотехнологических приложений ISAAA в мире зарегистрировано 495 ГМ линий 29 видов растений (по состоянию на 10.2017). В России по данным Роспотребнадзора и Россельхознадзора зарегистрировано 26 ГМ линий 5 видов растений (9 линий сои, 13 линий кукурузы, 1 линия риса, 1 линия сахарной свеклы, 2 линии

картофеля), которые разрешены для использования в продуктах питания, продовольственном сырье и кормах (по состоянию на 10.2017). Первым этапом ПЦР-РВ анализа на наличие ГМ растений является скрининг-анализ основных регуляторных последовательностей и генов, присутствующих в генетической конструкции кассеты экспрессии, встраиваемой в геном ГМ растений. Содержание основных регуляторных последовательностей в ГМ растениях составляет: 76% для промоторов 35SCaMV (вируса мозаики цветной капусты) и/или FMV (вируса мозаики норичника) и 66% - для терминатора NOS (*Agrobacterium tumefaciens*). Однако в настоящий момент при создании новых линий ГМО все чаще стали использовать другие регуляторные последовательности, и набора основных мишеней (35SCaMV, FMV, NOS) при скрининг-анализе может быть недостаточно для эффективного выявления большого числа ГМ растений. В качестве дополнительных мишеней для выявления ГМ растений можно рассматривать промотор SsuAra (из арабидопсиса) и терминатор E9 (из гороха), содержащиеся в 18% всех ГМ линий. При этом для некоторых видов растений эта задача является наиболее актуальной, так как промотор SsuAra и/или терминатор E9 содержится в 30-50% ГМ линий этих растений: 19 линий рапса из 40 содержат промотор SsuAra, 25 линий картофеля из 47 содержат терминатор E9, 16 линий хлопка из 59 содержат терминатор E9, 5 линий сои содержат промотор SsuAra и 13 линий сои содержат терминатор E9.

Цель исследований – разработать и валидировать мультиплексную ПЦР-РВ систему для обнаружения дополнительных регуляторных последовательностей ГМ растений: промотора SsuAra и терминатора E9.

Материалы и методы

Образцы

В работе всего было использовано 28 международных стандартных сертифицированных образцов (CRM), содержащих ДНК различных ГМ линий 5 видов растений: из них 12 линий ГМ кукурузы, 10 линий ГМ сои, 4 линии ГМ рапса, 1 линия ГМ свеклы и 1 линия ГМ риса (табл. 1). Образец сои 100% ГМ линии SYHTØH2 был получен из ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Для выделения ДНК не содержащих ГМ видов растений использовали растительные пищевые продукты, не содержащие ГМО (соя, кукуруза, рапс, горох, пшеница, картофель, томат, рис, свекла).

Таблица 1

Перечень стандартных сертифицированных референсных образцов (CRM), используемых в исследовании

№	Стандартный сертифицированный референсный образец (CRM)	Производитель, каталожный номер
ГМ линии кукурузы		
1	T25, 100%	0306-H6, AOCS, США
2	MIR162, 100%	1208-A, AOCS, США
3	MIR604, 100%	0607-A2, AOCS, США
4	5307, 100%	0411-D, AOCS, США
5	3272, 10%	ERMBF420C, IRMM, Бельгия
6	MON89034, 100%	0906-E, AOCS, США
7	Bt11, 4,89%	ERMBF412f, IRMM, Бельгия
8	GA21, 100%	0407-B, AOCS, США
9	MON863, 9,85%	ERMBF416d, IRMM, Бельгия
10	NK603, 5%	ERMBF415f, IRMM, Бельгия
11	MON88017, 100%	0406-D, AOCS, США
12	Bt176, 5%	ERMBF411F, IRMM, Бельгия

№	Стандартный сертифицированный референсный образец (CRM)	Производитель, каталожный номер
ГМ линии сои		
13	MON87705, 100%	0210-A, AOCS, США
14	MON87769, 100%	0809-B, AOCS, США
15	MON89788, 100%	0906-B, AOCS, США
16	A2704-12, 100%	0707-B8, AOCS, США
17	BPS-CV127-9, 100%	0911-C, AOCS, США
18	A5547-35, 100%	0707-C5, AOCS, США
19	MON87708, 100%	0311-A, AOCS, США
20	GTS 40-3-2, 10%	ERMBF410gk, IRMM, Бельгия
21	FG72, 100%	0610-A3, AOCS, США
22	MON87701, 100%	0809-A, AOCS, США
ГМ линии рапса		
23	MS1, 100%	0711-A2, AOCS, США
24	RF2, 100%	0711-C2, AOCS, США
25	GT73, 100%	0304-B, AOCS, США
26	MON88032, 100%	1011-A, AOCS, США
ГМ линии сахарной свеклы		
27	H7-1, 100%	ERMBF419b, IRMM, Бельгия
ГМ линии риса		
28	LLRICE62, 100%	0306-I6, AOCS, США

Выделение ДНК

Выделение ДНК из образцов растительного сырья производили с помощью набора «Сорб-ГМО-Б» (ВНИИСБ/Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Набор основан на сорбентном методе экстракции, использующем в качестве лизирующего реагента ионный детергент бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ) с последующим удалением примесей хлороформом и сорбцией ДНК на кремниевом сорбенте и очисткой. Растворы чистых образцов ДНК хранили при минус 20° С до использования. Оценку чистоты выделенной ДНК определяли по соотношению оптической плотности $A_{260/280}$ и измерение концентрации проводили на спектрофотометре NanoPhotometer P300 (Implen, Германия).

Дизайн и синтез олигонуклеотидных праймеров и зондов

Для выявления промотора SsuAra и терминатора E9 были модифицированы праймеры и зонды из литературного источника [6]. Для выявления гена, кодирующего NADH-дегидрогеназу растений, использовали ранее разработанные праймеры и зонды (табл. 2). Для детекции внутреннего положительного контроля (ВПК) использовали праймеры и зонд производства ООО «Синтол» (Россия).

Таблица 2

Олигонуклеотидные праймеры и зонды для обнаружения промотора SsuAra, терминатора E9 и гена, кодирующего NADH-дегидрогеназу растений

Обозначение	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'
Зонды	
T-E9-P	(Cy5)tc-att-aac-tct-tct-cca-tcc-at(T-BHQ2)-tcc-att-tca-cag-t(P)
P-SSuAra-P	(ROX)cc-tta-tcg-gct-tga-acc-gct-gga-ata-a(BHQ2)
NADH-Pr-up-P	(R6G)ccg-gcc-aga-acc-aca-cgt-gca-ag(BHQ2)

Обозначение	Нуклеотидная последовательность 5' – 3'
Праймеры	
P-SSuAra-F	ggc-cta-agg-aga-ggt-gtt-gag-a
P-SSuAra-R	ctc-ata-gat-aac-gat-aag-att-cat-gga-att
T-E9-F	tga-gaa-tga-aca-aaa-gga-cca-tat-ca
T-E9-R	ttt-tta-ttc-ggt-ttt-cgc-tat-cg
NADH-F	gac-gag-cca-cat-gca-ggg-aaa-ct
NADH-R	acc-gga-cca-tat-ctg-ctt-ttg-cg

Все зонды были сконструированы по типу TaqMan, т.е. включали на 5'-конце флуорофор, на 3'-конце – гаситель, а разобщение флуорофора и гасителя происходило за счет 5'-экзонуклеазной активности Taq-ДНК полимеразы. Праймеры и зонды были синтезированы твердофазным амидофосфитным триэфирным методом на олигонуклеотидном синтезаторе ASM-2000 (Новосибирск, Россия) с использованием реактивов ООО «Синтол» (Россия, Москва) и очищены электрофорезом в ПААГ и с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ по стандартной процедуре.

Проведение ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на амплификаторах: CFX96 (BioRad, США), АНК-48 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия), DTprime (ДНК-Технология, Россия) и RotorGene6000 (Corbett Research, Австралия).

Реакционная смесь объемом 25 мкл включала в себя: 10 мкл 2,5х реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ (ООО «Синтол», Россия), по 6 пмоль праймеров и 3 пмоль зонда для промотора SsuAra, по 10 пкмоль праймеров и 5 пкмоль зонда для терминатора E9, по 3 пкмоль праймеров и 4 пкмоль зонда для выявления гена, кодирующего NADH-дегидрогеназу растений, по 4 пкмоль праймеров и 1,9 пкмоль зонда для внутреннего положительного контроля, 2,5 ед. Hot-RescueTaq-ДНК полимеразы (ООО «Синтол», Россия) и 5 мкл образца ДНК.

Для приборов CFX96, АНК-48 и DTprime использовали следующую программу амплификации: 95°C – 300 с; 50 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 40 с.

Для прибора RotorGene6000: 94°C – 180 с; 45 циклов: 94°C – 15 с, 59°C – 50 с.

Результаты и обсуждение

Разработка мультиплексного ПЦР-РВ анализа и проверка специфичности праймеров и зондов

Для обнаружения дополнительных регуляторных последовательностей, встраиваемых в геном ГМ растений, был разработан мультиплексный ПЦР-РВ анализ, позволяющий одновременно обнаруживать и дифференцировать специфические последовательности промотора SsuAra и терминатора E9, а также контролировать наличие или отсутствие в образце растительной ДНК. В разработанной мультиплексной системе «Растение/SsuAra/E9/ВПК» объединены четыре ПЦР-РВ реакции в одной пробирке. Первая реакция позволяет обнаружить промотор SsuAra по каналу детекции флуоресценции ROX, вторая реакция предназначена для выявления терминатора E9 по каналу детекции флуоресценции Cy5. Третья реакция позволяет определить ген, кодирующий NADH-дегидрогеназу растений, по каналу детекции флуоресценции R6G (HEX) и оценить количество растительной ДНК. В исследуемом материале ДНК растения может быть не обнаружена по причине ингибирования ПЦР-РВ или недостаточной

эффективности выделения ДНК. Однако, отсутствие в образце растительной ДНК не означает того, что образец не содержит ГМО. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения ДНК на уровне не менее 20%. Следует учесть, что выявление ДНК ГМО методом ПЦР - не подходит для высокоочищенных продуктов и продуктов, подвергшихся сильной химической или ферментативной обработке [7]. Четвертая реакция выявляет специфический фрагмент внутреннего положительного контроля (ВПК) по каналу детекции флуоресценции FAM и позволяет исключить ложноотрицательные результаты. Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ПЦР-РВ и/или недостаточная эффективность выделения ДНК. В качестве ВПК использовали образец рекомбинантной плазмиды pTgt2 (ООО «Синтол», Россия).

Для оценки специфичности праймеров и зондов использовали образцы ДНК 9 видов растений, содержащих и не содержащих ГМ линии. Выборка из 28 ГМ линий включала образцы с разным набором генетических элементов в кассете экспрессии, встраиваемой в геном ГМ растений. Результаты оценки специфичности праймеров и зондов приведены в таблице 3.

Таблица 3

Оценка специфичности праймеров и зондов для обнаружения регуляторных последовательностей промотора SsuAra и терминатора E9

№	Образец, % ГМО	Пороговый цикл, Ct		
		HEX Растение	ROX pSsuAra	Cy5tE9
1	Соя MON87705, 100%	14,92±0,04	N/A*	22,64±0,04
2	Кукуруза T25, 100%	15,41±0,04	N/A	N/A
3	Соя MON87769, 100%	14,62±0,02	N/A	22,36±0,03
4	Соя MON89788, 100%	14,87±0,01	N/A	22,62±0,03
5	Сахарная свекла Н7-1, 100%	19,21±0,38	N/A	27,87±0,25
6	Рапс MS1, 100%	17,83±0,04	26,13±0,04	N/A
7	Рапс RF2, 100%	15,54±0,02	22,92±0,14	N/A
8	Кукуруза MIR162, 100%	15,24±0,01	N/A	N/A
9	Кукуруза MIR604, 100%	15,11±0,02	N/A	N/A
10	Кукуруза 5307, 100%	15,45±0,01	N/A	N/A
11	Кукуруза 3272, 10%	15,54±0,01	N/A	N/A
12	Кукуруза MON89034, 100%	15,55±0,01	N/A	N/A
13	Кукуруза Bt11, 4,89%	15,62±0,01	N/A	N/A
14	Кукуруза GA21, 100%	15,33±0,01	N/A	N/A
15	Кукуруза MON863, 9,85%	15,10±0,04	N/A	N/A
16	Кукуруза NK603, 5%	14,91±0,04	N/A	N/A
17	Кукуруза MON88017, 100%	17,14±0,04	N/A	N/A
18	Рапс MON88032, 100%	13,11±0,02	N/A	21,29±0,03
19	Рапс GT73, 100%	13,26±0,03	N/A	23,06±0,09
20	Соя 0%	18,02±0,01	N/A	N/A
21	Соя A2704-12, 100%	14,89±0,01	N/A	N/A
22	Кукуруза Bt176, 5%	17,62±0,04	N/A	N/A
23	Соя BPS-CV127-9, 100%	18,00±0,02	N/A	N/A
24	Соя A5547-35, 100%	17,58±0,02	N/A	N/A
25	Соя MON87708, 100%	14,88±0,01	N/A	22,66±0,02
26	Соя SYHT0H2, 100%	17,94±0,01	N/A	N/A
27	Соя GTS 40-3-2, 10%	14,30±0,02	N/A	N/A

№	Образец, % ГМО	Пороговый цикл, Ct		
		HEX Растение	ROX pSsuAra	Cy5tE9
28	Соя FG72, 100%	17,94±0,05	N/A	N/A
29	Рис LLRice62, 100%	27,37±0,45	N/A	N/A
30	Кукуруза, 0%	16,01±0,09	N/A	N/A
31	Горох, 0%	14,65±0,01	N/A	22,27±0,01
32	Соя MON87701, 100%	13,87±0,02	22,46±0,01	N/A
33	Рапс, 0%	14,65±0,04	N/A	N/A
34	Пшеница, 0%	15,53±0,01	N/A	N/A
35	Картофель%	17,82±0,01	N/A	N/A
36	Томат, 0%	15,81±0,03	N/A	N/A
37	Рис, 0%	15,27±0,01	N/A	N/A
38	Свекла, 0%	14,92±0,02	N/A	N/A
39	Отрицательный контрольный образец, ОКО (вода)	N/A	N/A	N/A

Примечание. N/A – рост сигнала флуоресценции отсутствует, результат отрицательный.

Полученные результаты показали 100% специфичность разработанной мультиплексной ПЦР-РВ системы «Растение/SsuAra/E9/ВПК» на исследованной выборке образцов. Ложноотрицательные результаты при анализе образцов ГМ линий растений, содержащих промотор *SsuAra* и терминатор *E9*, отсутствовали. Рост сигнала флуоресценции по каналу ROX, соответствующему промотору *SsuAra*, наблюдался только в образцах ГМ линий сои MON87701 и рапса MS1 и RF2, содержащих в генетических конструкциях данный промотор. Рост сигнала флуоресценции по каналу Cy5, соответствующему терминатору *E9*, наблюдался только в реакциях с образцами ГМ линий сои MON87705, MON87769, MON89788, MON87708, рапса MON88032, GT73 и сахарной свеклы H7-1, содержащих в генетических конструкциях касет экспрессии данный терминатор. Ложноположительные результаты при анализе ГМ линий, содержащих другие регуляторные последовательности в касете экспрессии, отличные от промотора *SsuAra* и терминатора *E9*, отсутствовали. Ложноположительных результатов среди образцов 9 видов не ГМ растений, не выявлено, за исключением обнаружения последовательности терминатора *E9* в *Pisum sativum* (горох), так как данная последовательность является природной последовательностью этого растения.

Эффективность и чувствительность мультиплексной ПЦР-РВ

Важными характеристиками любой мультиплексной системы ПЦР-РВ анализа являются эффективность и чувствительность всей системы в целом по сравнению с характеристиками отдельных реакций. Взаимное влияние нескольких реакций, объединенных в мультиплексную систему, не должно снижать параметры моноплексных систем.

Эффективность реакций обнаружения ДНК растения, промотора *SsuAra* и терминатора *E9* в разработанной мультиплексной ПЦР-РВ системе «Растение/SsuAra/E9/ВПК» исследовали на серии образцов, полученных путем серии десятикратных разведений смеси ДНК 100% ГМ сои линий MON89788 и MON87701 из начальной концентрации

100 нг/мкл (линия MON89788 содержит терминатор *E9*, линия MON87701 содержит промотор *SsuAra*). На рисунке 1 показаны результаты ПЦР-РВ анализа. Эффективность каждой реакции, входящей в мультиплексную систему, и эффективность всей мультиплексной системы в целом оценивали в сравнении с эффективностями реакций моноплексных систем. Эффективность реакции по каналу детекции промотора *SsuAra* (ROX) составила 97,3% в случае отдельной реакции и 97% в случае мультиплексной ПЦР-РВ. Эффективность реакции по каналу детекции терминатора *E9* (Cy5) составила 97,6% в случае моносистемы и 97,1% в случае мультиплексной ПЦР-РВ. Эффективность реакции по каналу детекции растительной ДНК (HEX) составила 98,4% в случае моносистемы и 98,9% в случае мультиплексной системы ПЦР-РВ анализа. Общая эффективность разработанной мультиплексной ПЦР-РВ системы «Растение/*SsuAra*/*E9*/ВПК» составила 97,3%, а коэффициент корреляции R^2 составил 0,9989.

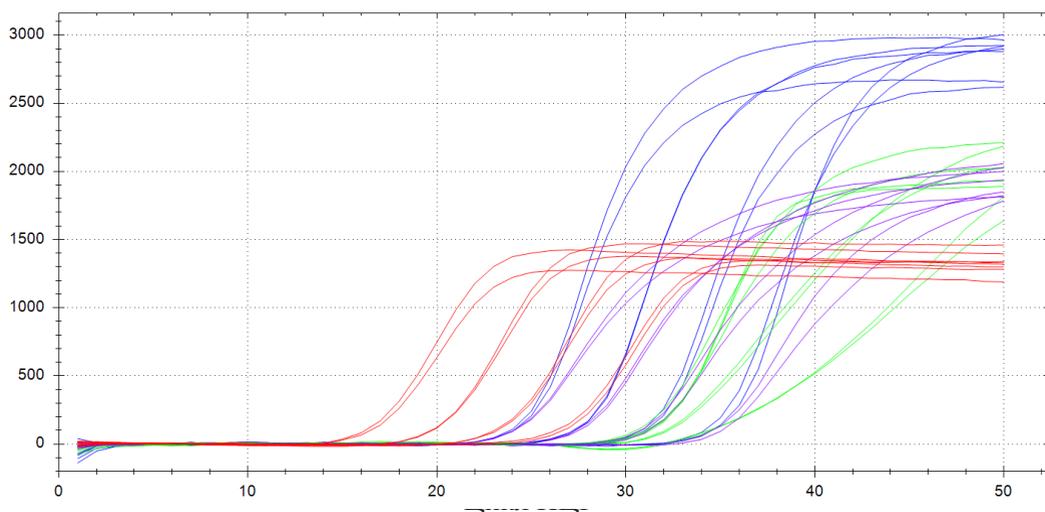


Рис. 1. Кинетические кривые флуоресценции*, полученные для образцов серии десятикратных разведений смеси ДНК сои ГМ линий MON89788 и MON87701 в мультиплексной системе «Растение/*SsuAra*/*E9*/ВПК» на приборе для ПЦР-РВ CFX96 (BioRad, США). Коэффициент корреляции $R^2 = 0,9989$, эффективность мультиплексной ПЦР-РВ – 97,3%

Примечание. Цвета, соответствующие каналам детекции флуоресценции: FAM (ВПК) – зеленый, HEX (растение) – красный, ROX (p*SsuAra*) – фиолетовый, Cy5 (t*E9*) – синий.

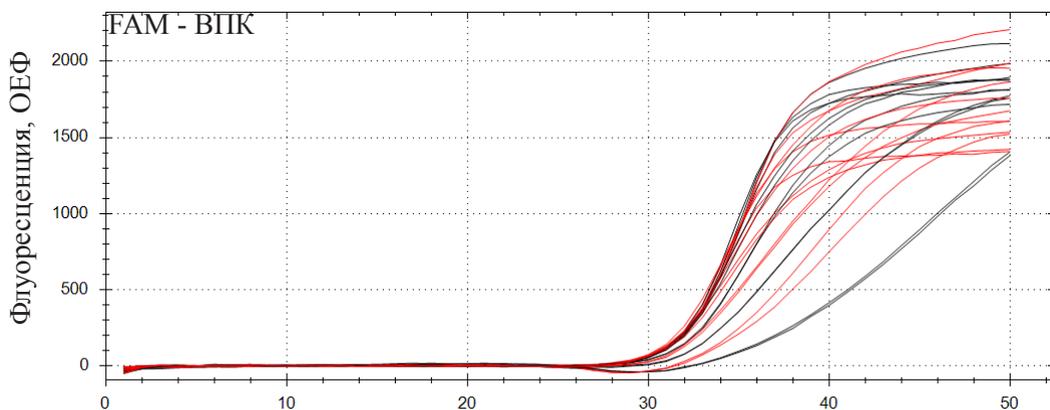
Чувствительность мультиплексной системы «Растение/*SsuAra*/*E9*/ВПК» определяли на образцах ДНК, содержащих разный процент ДНК ГМ сои линии MON87701. Для этого раствор ДНК, выделенный из 100% ГМ линии сои, разводили раствором ДНК, выделенным из не ГМ сои, до заданного процентного соотношения: 10%, 1%, 0,1%, 0,01%. Образцы ДНК с разным процентом ГМ линии, исследовали для концентраций общей ДНК сои: 100 нг/мкл, 10 нг/мкл, 1 нг/мкл, 0,5 нг/мкл, 0,2 нг/мкл и 0,1 нг/мкл при вносимом объеме пробы 5 мкл в реакцию. Установлено, что предел обнаружения промотора *SsuAra* при концентрации растительной ДНК 500 нг в пробе составляет 0,01% ГМ линии, при концентрации растительной ДНК 5 нг в пробе – 0,1% ГМ линии, при концентрации 1 нг в пробе – 1% ГМ линии. При пересчете

на геном-эквивалент (гэ) сои чувствительность мультиплексной системы «Растение/SsuAra/E9/ВПК» составляет 4,33-8,66 гэ ГМ линии сои [5].

Валидация набора реагентов на основе мультиплексной ПЦР-РВ системы «Растение/SsuAra/E9/ВПК»

На основе разработанной мультиплексной ПЦР-РВ системы для обнаружения регуляторных последовательностей ГМ растений промотора *SsuAra* и терминатора *E9* был валидирован соответствующий набор реагентов «Растение/SsuAra/E9/ВПК». Целью валидации являлось определение специфичности, предела обнаружения, а также подтверждение повторяемости/воспроизводимости (сходимости) результатов испытаний. Показатели специфичности и предела обнаружения набора реагентов полностью подтвердили соответствующие характеристики, полученные ранее при разработке и исследовании мультиплексной ПЦР-РВ системы. Для исследования повторяемости/воспроизводимости результатов анализа, полученных с помощью набора реагентов «Растение/SsuAra/E9/ВПК», была приготовлена серия из пяти образцов десятикратных разведений смеси ДНК ГМ сои линий MON89788 и MON87701 из начальной концентрации 100 нг/мкл (100 нг/мкл, 10 нг/мкл, 1 нг/мкл, 0,1 нг/мкл, 0,01 нг/мкл). Повторяемость результатов исследовали в экспериментах, проведенных на одном и том же амплификаторе CFX96 одним оператором с использованием разных серий набора реагентов. Воспроизводимость результатов исследовали при параллельных экспериментах на разных моделях амплификаторов: RotorGene6000, АНК-48, DTprime и CFX96 на одной и той же серии набора реагентов в разные дни. Каждый из пяти образцов серии десятикратных разведений в каждом эксперименте анализировали в пяти повторах. Результаты испытаний серии образцов с целью валидации набора реагентов «Растение/SsuAra/E9/ВПК» подтвердили 100% повторяемость (сходимость) и 100% воспроизводимость результатов (данные не приведены).

Дополнительно при валидации исследовали стабильность (срок годности) набора реагентов «Растение/SsuAra/E9/ВПК». Для подтверждения срока годности набора реагентов проверяли методом ускоренного хранения в течение 7 дней при +37°C, что соответствует результатам, получаемым при хранении набора в течение одного года при минус 20°C. На рисунке 2 показаны кривые флуоресценции, соответствующие каждому каналу детекции, для набора реагентов через 7 дней хранения при +37°C в сравнении с набором, хранившимся при минус 20°C. Полученные результаты исследования наборов, хранившихся при разных условиях, полностью идентичны.



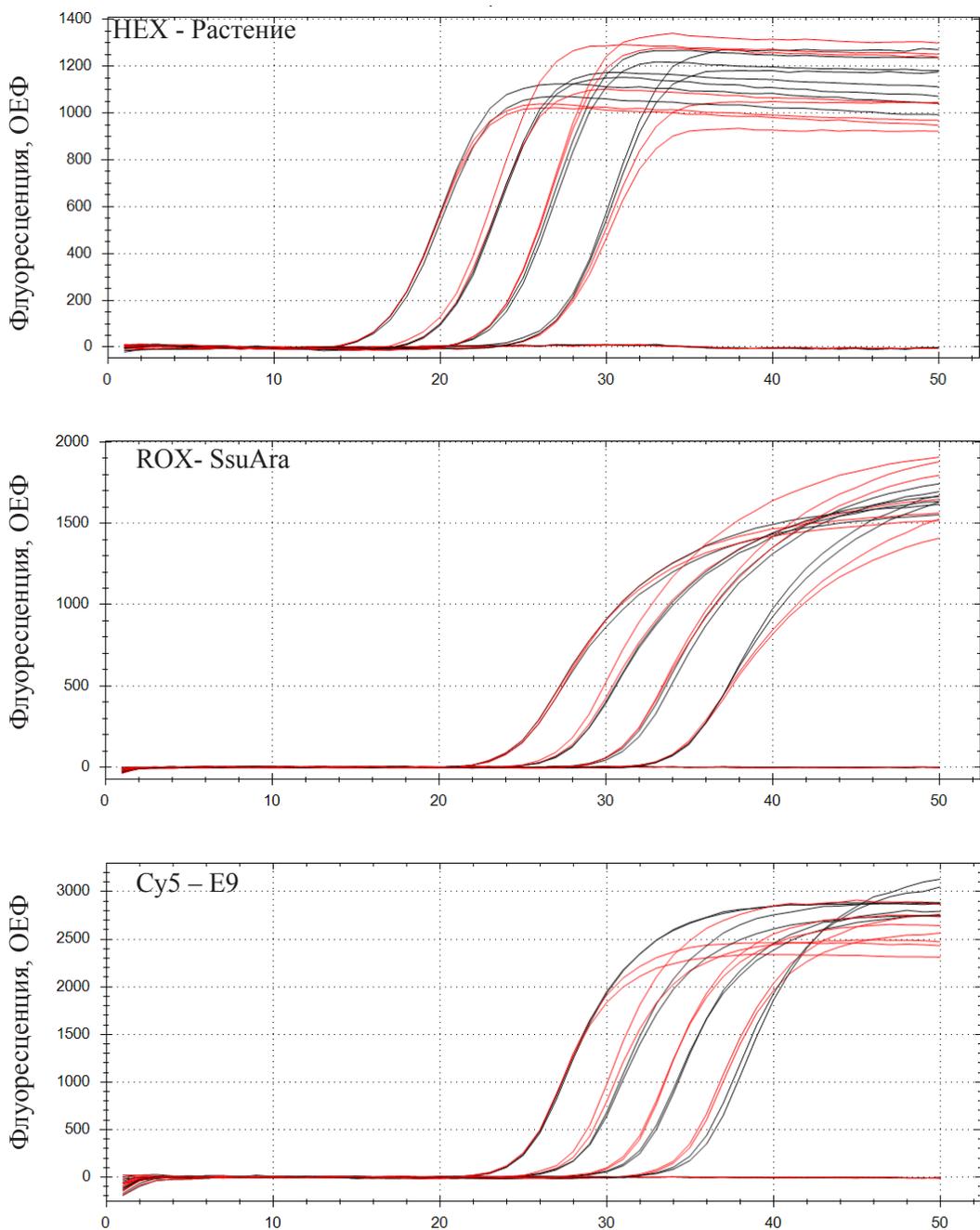


Рис. 2. Кинетические кривые флуоресценции*, полученные для серии четырех десятикратных разведений смеси ДНК ГМ сои линий MON89788 и MON87701 с помощью набора реагентов «Растение/SsuAra/E9» на приборе для ПЦР-РВ CFX96 (BioRad, США)

Примечание. Кривые флуоресценции, полученные для набора реагентов, хранившегося при минус 20 °С, выделены черным цветом; кривые флуоресценции, полученные для набора реагентов, хранившегося при +37 °С, выделены красным цветом.

Исключение ложноположительных результатов

При обнаружении различных генетических элементов, содержащихся в генетической конструкции кассеты экспрессии, встраиваемой в геном ГМ растений, важно знать природу соответствующего генетического элемента, т.е. природный объект, из которого была выделена специфическая последовательность того или иного гена, промотора, терминатора. Это необходимо для исключения ложноположительных результатов анализа. Так, например, промотор *35S CaMV*, присутствующий более чем в 70% ГМ растений, выделен из ДНК вируса мозаики цветной капусты (*Cauliflower mosaic virus, CaMV*), способного поражать ткани растений из семейства крестоцветных (*Brassicaceae*) – капуста, рапс, хрен, горчица и др. Аналогично, терминатор *E9* был выделен из генома гороха (*Pisum sativum*), а промотор *SsuAra* – из арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (резуховидка Тяля)). Так как горох является одним из растений, часто используемым в пищевой продукции и кормах, необходимо обязательно анализировать образцы с положительным результатом на терминатор *E9* на наличие в них ДНК гороха (*Pisum sativum*). Для этой цели была разработана и апробирована мультиплексная ПЦР-РВ система «Горох/Е9», позволяющая обнаруживать ДНК гороха и дифференцировать природу последовательности терминатора *E9* (данные будут опубликованы отдельно).

Заключение

Разработанная мультиплексная система ПЦР-РВ анализа для обнаружения и дифференциации регуляторных последовательностей, встраиваемых в геном ГМ растений, промотора *SsuAra* и терминатора *E9*, и оценки наличия растительной ДНК может быть использована для скрининг-анализа на наличие ДНК ГМО в образцах пищевой продукции, продовольственном сырье, кормах и семенах на всех этапах переработки, транспортировки и хранения. Показана 100% специфичность анализа при исследовании 28 ГМ линий 5 видов растений и 9 видов растений, наиболее часто встречающихся в продуктах питания и кормах, а также не ГМ растений. Предел обнаружения регуляторных последовательностей при концентрации растительной ДНК 500 нг в пробе составляет 0,01% ГМ линии, при концентрации растительной ДНК 5 нг в пробе – 0,1% ГМ линии, при концентрации 1 нг в пробе – 1% ГМ линии. На основе разработанной мультиплексной ПЦР-РВ системы валидирован набор реагентов «Растение/SsuAra/E9/ВПК». Эффективность ПЦР-РВ для разработанного набора реагентов составила 97,3%. Подтверждена 100% повторяемость и воспроизводимость результатов анализа. Набор может быть использован в лабораторных центрах и ветеринарных лабораториях, проводящих контроль продовольственного сырья и пищевых продуктов, кормов и семян в целях обнаружения ДНК ГМО растительного происхождения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства научных организаций, государственное задание ФГБНУ ВНИИСБ № 0574-2015-0006 по теме «Разработка и валидация наборов реагентов для качественного и количественного анализа ГМО.»

Работа выполнена с использованием дорогостоящего оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ.

Библиографический список

1. ГОСТ Р 55576-2013. Корма и кормовые добавки. Метод качественного определения регуляторных последовательностей в геноме сои и кукурузы. М. Стандартинформ, 2014. 9 с.

2. ГОСТ Р 56058-2014. Корма и кормовые добавки. Методы идентификации и количественного определения ГМО растительного происхождения. М. Стандартинформ, 2015. 6 с.
3. ГОСТ Р 53244-2008. Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот. М. Стандартинформ, 2009. 61 с.
4. Осуществление надзора за производством и оборотом пищевых продуктов, содержащих ГМО: Сборник методических указаний. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. Ч. 1: Методы идентификации и количественного определения генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения: МУК 4.2.2304-07. 83 с.
5. Arumuganathan K. and Earle E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 9 (3). Pp. 208–218.
6. Deboode F., Janssen E., Berben G. (2013) Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminators (t35S, tE9, tOCS, tg7). *Eur Food Res Technol* 236. Pp. 659–669.
7. ISO 21571:2005. Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF MULTIPLEX REAL-TIME PCR TEST SYSTEM FOR ANALYZING REGULATOR ELEMENTS (*SsuAra* PROMOTER AND *E9* TERMINATOR) TO DETECT GENETICALLY-MODIFIED STRAINS OF RAPE, SOYBEANS, POTATOES AND OTHER PLANTS

Yu.S. ALYAPKINA¹, M.V. MOISEYEVA^{1,2}, O.V. KSENOFONTOVA¹,
Ya.I. ALEKSEYEV^{1,2}

(1“Syntol” Company; 2All-Russia Research Institute of Agriculture Biotechnology)

The authors have developed a multiplex system for the real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) analysis of additional regulatory sequences inserted into the genome of the GM plants, namely, SsuAra promoter and E9 terminator; and the evaluation of the presence of plant DNA in the test samples. The tests have proved the 100% specificity of the primers and probes used in the study of 28 GM lines of 5 plant species and 9 plant species most common in food and feed, as well as non-GM plants. The detection limit of regulatory sequences has accounted for 0.01% of the GM line at a plant DNA concentration of 500 ng in the sample, 0.1% of the GM line with 5 ng of plant DNA in the sample, and 1% of the GM line with 1 ng of plant DNA in the sample. The efficiency and sensitivity of each of the four reactions included in the multiplex system has been identical in the same characteristics with monoplex systems. Basing on the developed multiplex real-time PCR system, the authors have validated the reagent kit “Plant/SsuAra/E9/MIC”. The efficiency of the real-time PCR for the developed reagent kit has proved to be more than 95%. The authors have confirmed the 100% repeatability and reproducibility of test results. The kit can be used for screening of any plants for the purpose of detecting GMO DNA, especially when studying plant species such as rape, potato, soybean, cotton, which are most common to contain SsuAra promoter and E9 terminator in the genomes of GM lines.

Key words: *real-time polymerase chain reaction (real-time PCR), analysis of genetically modified organisms, promoter SsuAra, terminator E9.*

References

1. GOST R 55576-2013. Korma i kormovyye dobavki. Metod kachestvennogo opredeleniya regulatorynykh posledovatel'nostey v genome soi i kukuruzy [Feed types and feed additives. The method of qualitative determination of regulatory sequences in the soybean and maize genome]. M. Standartinform, 2014. 9 p.
4. GOST R 56058-2014. Korma i kormovyye dobavki. Metody identifikatsii i kolichestvennogo opredeleniya GMO rastitel'nogo proiskhozhdeniya [Feed and feed additives. Methods for identification and quantification of phyto-genic GMOs]. M. Standartinform, 2015. 6 p.
3. GOST R 53244-2008. Produkty pishchevyye. Metody analiza dlya obnaruzheniya geneticheski modifitsirovannykh organizmov i poluchennykh iz nikh produktov. Metody, osnovannyye na kolichestvennom opredelenii nukleinykh kislot [Food products. Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and products obtained from them. Methods based on the quantitative determination of nucleic acids]. M. Standartinform, 2009. 61 p.
4. Osushchestvleniye nadzora za proizvodstvom i oborotom pishchevykh produktov, sodержashchikh GMO: Sbornik metodicheskikh ukazaniy [Supervising the production process and turnover of food products containing GMOs: Reference book of methodological guidelines]. M.: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2008. Part 1: Metody identifikatsii i kolichestvennogo opredeleniya genno-inzhenerno-modifitsirovannykh organizmov rastitel'nogo proiskhozhdeniya: MUK 4.2.2304-07. 83 p.
5. *Arumuganathan K., Earle E.D.* (1991) Nuclear DNA content of some important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 9 (3). Pp. 208–218.
6. *Debode F., Janssen E., Berben G.* (2013) Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminators (t35S, tE9, tOCS, tg7). *Eur Food Res Technol* 236. Pp. 659–669.
7. ISO 21571:2005. Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction.

Аляпкина Юлия Сергеевна – к. б. н., вед. науч. сотр. ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (495) 984-69-93); e-mail: yulisyntol@mail.ru).

Моисеева Мария Викторовна – мл. науч. сотр. ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии», науч. сотр. ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (495) 984-69-93; e-mail: maria.moiseeva92@gmail.com).

Ксенофонтова Оксана Владимировна – науч. сотр. ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (495) 984-69-93); e-mail: oksanasogreeva@mail.ru).

Алексеев Яков Игоревич – зав. лабораторией анализа ГМО ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, научный директор ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (495) 984-69-93); e-mail: jalex@iab.ac.ru).

Yulia S. Alyapkina – PhD (Bio), Key Researcher, “Syntol” company (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; phone: +7 (495) 984-6993); e-mail: yulisyntol@mail.ru).

Maria V. Moiseyeva – Junior Researcher, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Researcher of the “Syntol” company (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; phone: +7 (495) 984-6993; email: maria.moiseeva92@gmail.com).

Oksana V. Ksenofontova – Researcher of the “Syntol” company (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; phone: +7 (495) 984-6993); e-mail: oksanasogreeva@mail.ru).

Yakov I. Alekseyev – Head of the Laboratory of GMO analysis, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Scientific Director of the “Syntol” company (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; phone: +7 (499) 976-65-44); e-mail: jalex@iab.ac.ru).