

УДК 573.6

РАЗРАБОТКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ КУКУРУЗЫ ЛИНИЙ 5307 И MON89034 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

М.В. МОИСЕЕВА^{1,2}, Е.Ю. БУКИНА², Я.И. АЛЕКСЕЕВ¹,
Е.В. БЕЛЕНОВИЧ¹, О.В. КУЗУБОВА¹, Д.А. ВАРЛАМОВ^{1,2},
Е.С. МАЗУРИН¹, П.Н. ХАРЧЕНКО¹

(¹ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии;

² Закрытое акционерное общество «Синтол»)

В Российской Федерации пищевые продукты, содержащие генетически модифицированные организмы (ГМО), подлежат обязательной маркировке. Распространенным методом выявления ДНК ГМО является полимеразная цепная реакция в реальном времени. Нами были разработаны два новых набора реагентов, обеспечивающих возможность выявления генетически модифицированной кукурузы линий 5307 и MON89034, разрешенных в 2014 г. для использования в продуктах питания, пищевом сырье и кормах для животных на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция в реальном времени, анализ генетически модифицированных организмов, кукуруза линии 5307, кукуруза линии MON89034.

Кукуруза — ценная сельскохозяйственная культура, широко используемая в пищевой и легкой промышленности, а также в производстве кормов. Это основной источник крахмала, который применяется в бумажной, строительной промышленности и фармацевтике. Она также является сырьем в производстве биогаза и биоэтанола.

С каждым годом в мире возрастает производство сельскохозяйственных ГМ культур. По данным ISAAA [5], в 2014 г. суммарная площадь посевов ГМ культур составила 181,5 млн га. Правительство Российской Федерации уделяет большое внимание безопасности продуктов питания человека и кормов для животных. В России обязательной маркировке подлежит продукция, содержащая более 0,9% ДНК ГМО.

По состоянию на 2015 г. на территории Российской Федерации для использования в продуктах питания, пищевом сырье и кормах для животных разрешены 23 вида линий ГМ растений: 7 линий сои, 12 линий кукурузы, 1 линия риса, 1 линия сахарной свеклы, 2 линии картофеля [4]. В частности, в 2014 г. были зарегистрированы две новые линии ГМ кукурузы: 5307 и MON89034. В связи с этим появилась необходимость разработки наборов реагентов для обнаружения и идентификации данных линий.

Линия кукурузы 5307 устойчива к жесткокрылым насекомым-вредителям рода *Diabrotica*. Линия кукурузы MON89034 устойчива к чешуекрылым насекомым. Регуляторные последовательности и трансгенные вставки этих линий перечислены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

**Регуляторные последовательности
и гены вставок линий кукурузы 5307 и MON89034**

Линия ГМО	Производитель	Промотор	Ген	Терминатор
Кукуруза 5307	SyngentaAG, Швейцария	CMP ZmUbilnt	<i>Pmi</i> <i>Ecry3.1Ab</i>	NOS
Кукуруза MON89034	Monsanto Company, США	CaMV35S CaMV 35S FMV 35S	<i>Cry2Ab2</i> <i>Cry1A.105</i>	NOS T-Hsp17

Устойчивость к насекомым возникает благодаря введенным в геном кукурузы генов *Cry2Ab2*, *Cry1A.105* и *Ecry3.1Ab* (это синтетическая форма генов *Cry3A* и *Cry1Ab* бактерий *Bacillus thuringiensis*). Эти гены отвечают за синтез эндотоксинов, действие которых основано на специфическом связывании с рецепторами клеток кишечного эпителия насекомого, что приводит к нарушению осмотического равновесия и лизису клеток [8].

Одним из наиболее широко используемых методов обнаружения ГМО является полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) [1, 2, 9]. Метод позволяет быстро и с высокой специфичностью и чувствительностью исследовать любой образец, содержащий ДНК.

Материалы и методы

Для обнаружения ДНК кукурузы линий 5307 и MON89034 был проведен дизайн праймеров и зондов для ПЦР-РВ на основании анализа последовательностей генов, взятых из официальных международных данных [6, 7].

Исследование специфичности и чувствительности разработанных праймеров и зондов проводили с помощью реакционных смесей, подготовленных следующим образом. В готовую 2,5-кратную реакционную смесь с Taq-ДНК полимеразой (ЗАО «Синтол», Россия) добавляли по 6 пмоль каждого праймера и 4 пмоль зонда, 5 мкл исследуемой ДНК и стерильную бидистиллированную воду до конечного объема 25 мкл.

Использовали стандартные образцы, содержащие ДНК линий ГМ кукурузы (MON810, Vt11, MON88017, T25, NK603, 5307, MON89034), сои (GTS4032, A2704-12, A5547-35, MON89788), а также различные пищевые продукты, не содержащие ГМО. ДНК из образцов выделяли набором «Сорб-ГМО-Б» (ВНИИСБ/Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Исследования методом ПЦР-РВ проводили на приборе АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) при следующих условиях: 95°C — 300 с, (60°C — 40 с, 95°C — 15 с) 50 циклов.

Результаты

Специфичность праймеров и зонда для обнаружения ДНК кукурузы линии MON89034 была исследована методом ПЦР-РВ на образцах ДНК, выделенных из сои, кукурузы, риса, ГМ-линий сои (GTS4032, A2704-12, A5547-35, MON89788) и ГМ-линий кукурузы (MON810, Bt11, MON88017, T25, NK603, 5307, MON89034). Возрастание сигнала флуоресценции наблюдалось только в реакции с образцом ДНК, выделенным из кукурузы линии MON89034. Для всех остальных образцов возрастание сигнала флуоресценции не наблюдалось, что подтверждает специфичность подобранных праймеров и зонда для ПЦР-РВ на исследованной выборке. Исследования специфичности праймеров и зонда для обнаружения ДНК кукурузы линии 5307 показали аналогичные результаты (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Специфичность подобранных праймеров и зондов

№	Образец, % ГМО	Результаты анализа, пороговый цикл реакции по каналу ROX (n=3)	
		кукуруза линии MON89034	кукуруза линии 5307
1	Соя, 0%	≥ 50	≥ 50
2	Кукуруза, 0%	≥ 50	≥ 50
3	Рис, 0%	≥ 50	≥ 50
4	Соя GTS 40-3-2, 100%	≥ 50	≥ 50
5	Соя A27, 100%	≥ 50	≥ 50
6	Соя A5547-35, 100%	≥ 50	≥ 50
7	Соя MON89788, 100%	≥ 50	≥ 50
8	Кукуруза MON810, 100%	≥ 50	≥ 50
9	Кукуруза Bt11, 100%	≥ 50	≥ 50
10	Кукуруза T25, 100%	≥ 50	≥ 50
11	Кукуруза NK603, 100%	≥ 50	≥ 50
12	Кукуруза MON88017, 100%	≥ 50	≥ 50
13	Кукуруза 5307, 100%	≥ 50	22,64±0,04
14	Кукуруза MON89034, 100%	22,89±0,01	≥ 50
15	Отрицательный контрольный образец (вода)	≥ 50	≥ 50

Чувствительность определения ДНК ГМ-линий кукурузы с использованием разработанных праймеров и зондов исследовали на серии образцов, полученных путем десятикратных разведений раствора ДНК, выделенного из стандартных образцов, содержащих 100% ГМ кукурузу. Анализ кинетических кривых ПЦР-РВ проводили, используя аппроксимацию рекурсивными функциями [3]. На рисунке 1 показаны результаты анализа.

Для исключения ложноотрицательных результатов в состав реакционных смесей был введен внутренний положительный контроль (ВПК), представляющий собой синтетическую плазмидную ДНК и пару праймеров и зонд для ее выявления. В наборе реагентов «Кукуруза MON89034 идентификация» по каналу детекции флуоресцентного красителя ROX (карбокси-X-родамин) проводится выявление фрагмента гена (*Cry2Ab2*) кукурузы линии MON89034, по каналу детекции флуоресцентного красителя Cy5 (индодикарбоцианин) — выявление ДНК внутреннего положительного контроля. Аналогичный дизайн имеет набор реагентов «Кукуруза 5307 идентификация», за исключением того, что по каналу детекции ROX выявляется фрагмент гена **ecry3.1Ab** кукурузы линии 5307.

Эффективность работы наборов реагентов «Кукуруза MON89034 идентификация» и «Кукуруза 5307 идентификация» определяли на образцах ДНК, содержащих разный процент ГМ ДНК соответствующей линии. Для этого раствор ДНК, выделенный из 100% ГМ линии кукурузы, разводили раствором ДНК, выделенным из не ГМ кукурузы до заданного процентного соотношения. На рисунке 2 приведен пример работы набора реагентов «Кукуруза MON89034 идентификация» на серии образцов с различным содержанием ДНК кукурузы линии MON89034 (10%, 1%, 0,1%, 0,01%) по двум каналам детекции. Пример работы набора реагентов «Кукуруза 5307 идентификация» на серии образцов с различным содержанием ДНК кукурузы линии 5307 (10%, 1%, 0,1%, 0,01%) приведен на рисунке 3.

Наборы были апробированы на четырех видах ГМ сои, семи видах ГМ кукурузы и трех видах не ГМ растений, наиболее часто встречающихся в продуктах питания и кормах (соя, кукуруза, рис).

В результате проведенных экспериментов было установлено, что аналитическая чувствительность разработанных наборов реагентов составляет 0,01% содержания ДНК ГМО в образце, что соответствует 10 геном-эквивалентам в реакции. Коэффициент корреляции R^2 , рассчитанный с помощью метода наименьших квадратов, при исследовании серии четырех десятикратных разведений составил 0,999. Эффективность ПЦР-РВ для разработанных наборов составила более 95%. Специфичность определения на исследованной выборке составила 100%.

Заключение

Разработаны наборы реагентов «Кукуруза 5307 идентификация» и «Кукуруза MON89034 идентификация», позволяющие выявлять и идентифицировать ДНК линий кукурузы 5307 и MON89034 в продуктах питания, пищевом сырье и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.621.21.0003 от 15.08.2014 г. RFMEFI62114X0003) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования «Биотехнология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии.

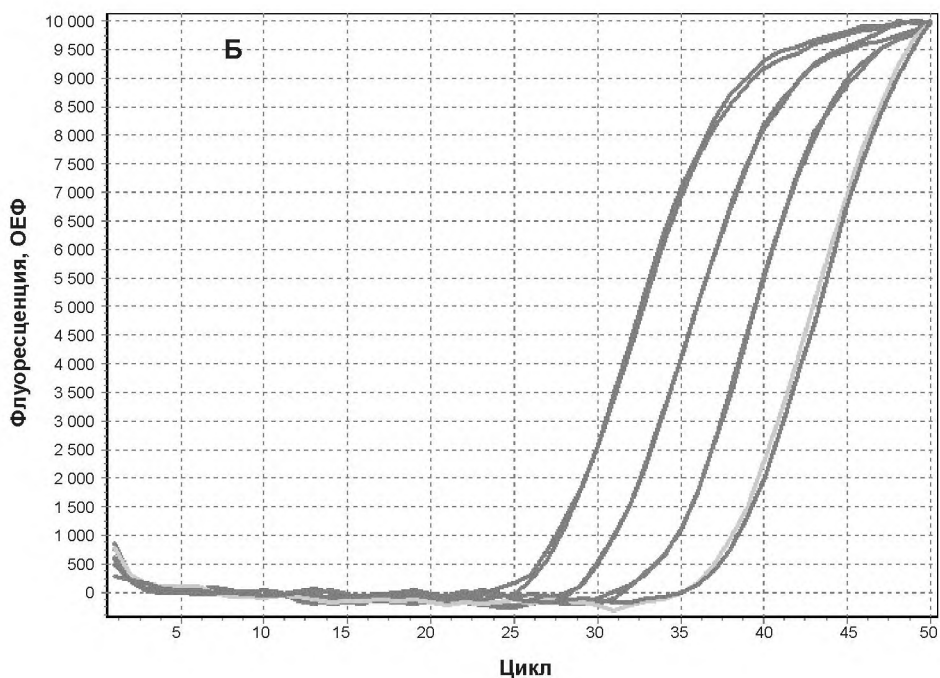
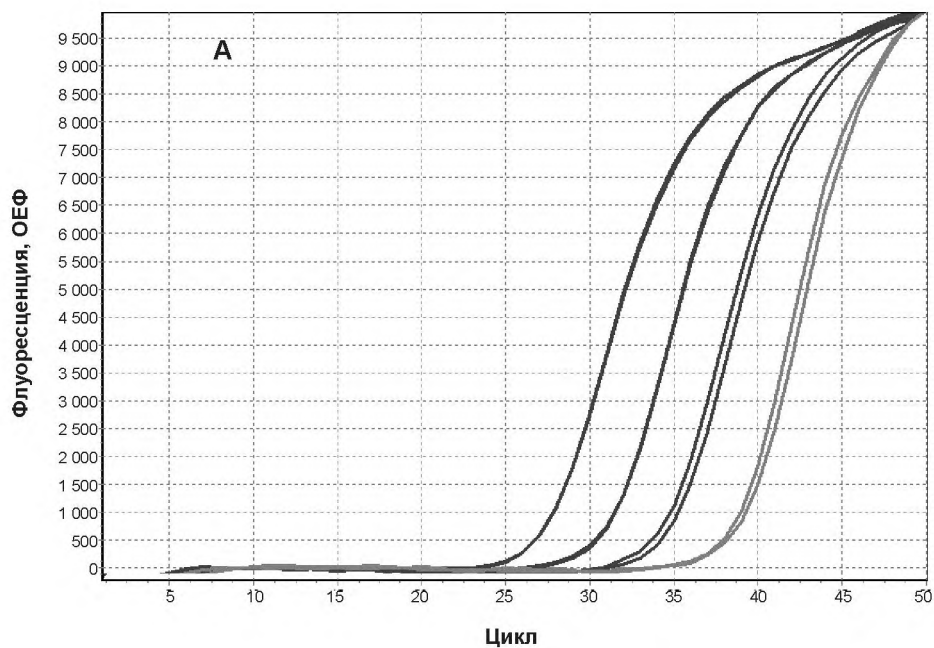


Рис. 1. Кинетические кривые серии десятикратных разведений ДНК ГМ кукурузы линии MON89034 (А) и линии 5307 (Б)

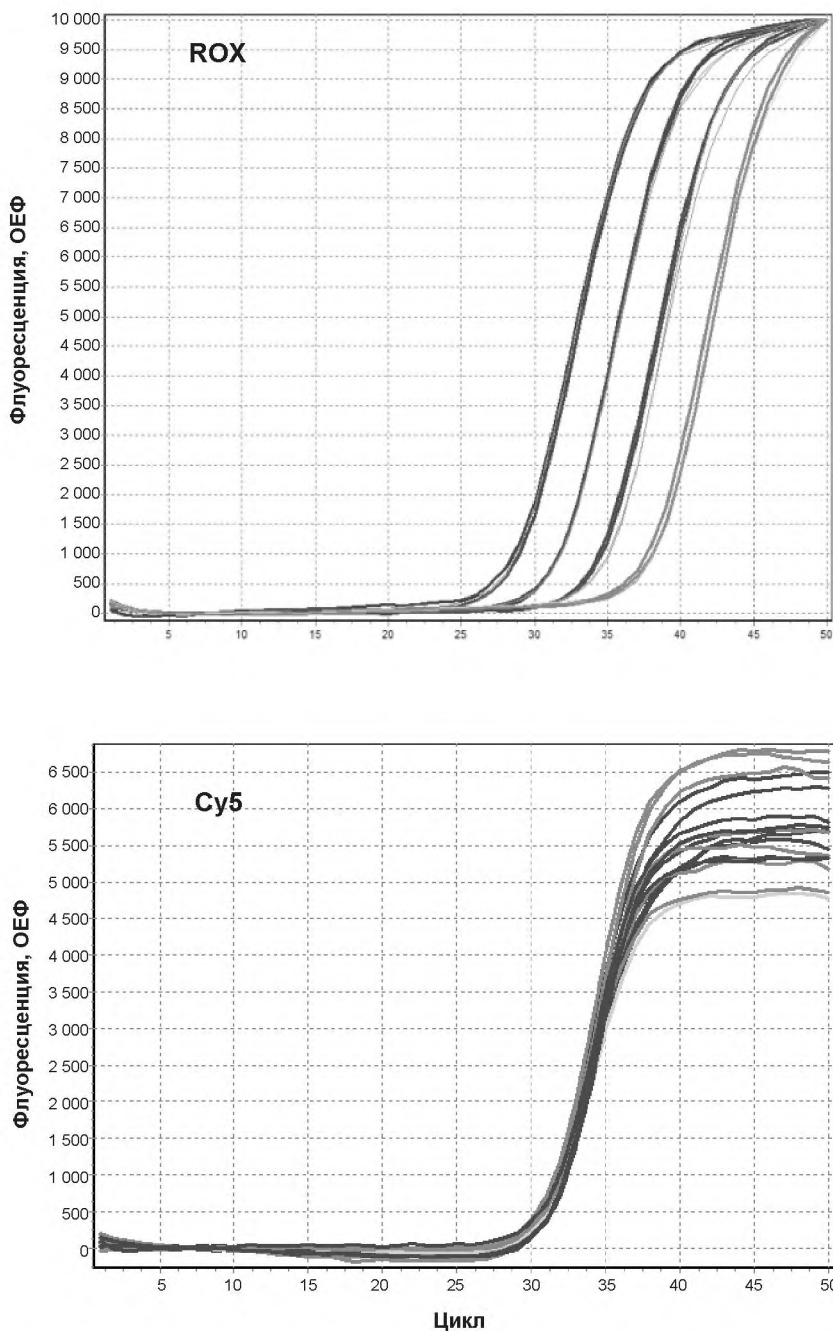


Рис. 2. Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции при ПЦР-РВ анализе образцов с различным содержанием ДНК кукурузы линии MON89034 (10%, 1%, 0,1%, 0,01%), полученные с помощью набора реагентов «Кукуруза MON89034 идентификация». Коэффициент корреляции R^2 составил 0,9987, эффективность ПЦР-РВ — 96,9%

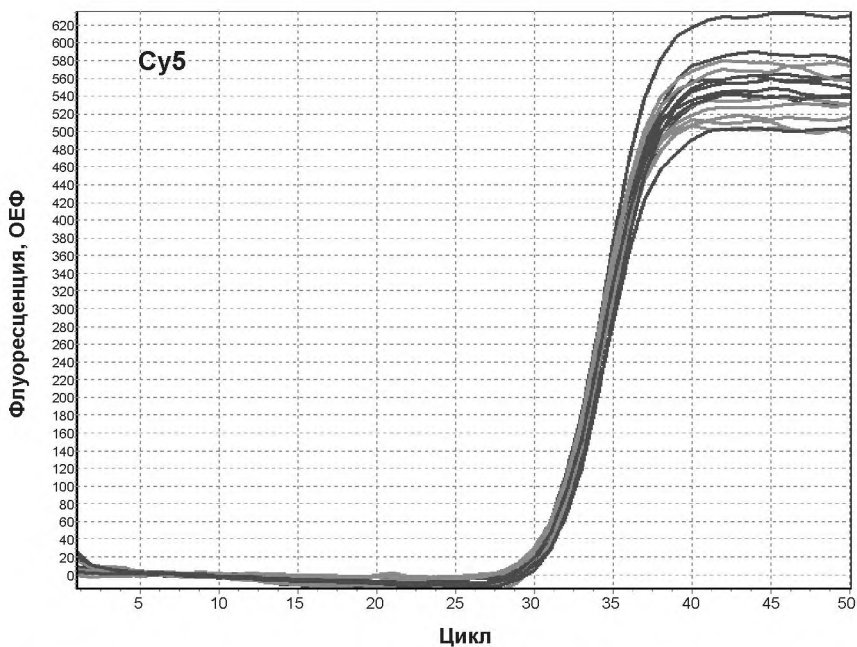
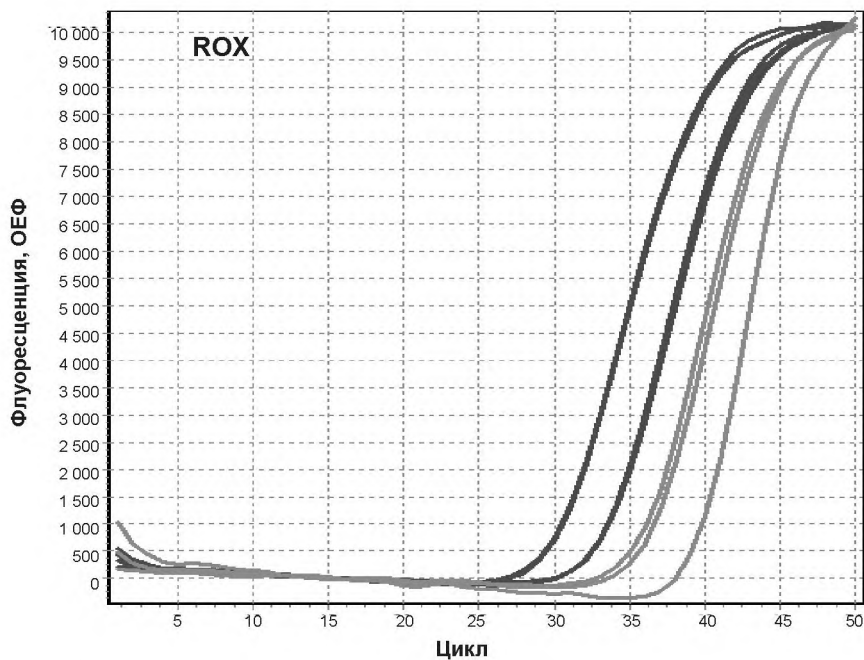


Рис. 3. Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции при ПЦР-РВ анализе образцов с различным содержанием ДНК кукурузы линии 5307 (10%, 1%, 0,1%, 0,01%), полученные с помощью набора реагентов «Кукуруза 5307 идентификация». Коэффициент корреляции R^2 составил 0,9990, эффективность ПЦР-РВ — 99,2%

Библиографический список

1. Алексеев Я.И. и др. 35S промотор вируса мозаики норичника (P-FMV) — новая мишень для анализа на содержание генетически модифицированных организмов // Известия ТСХА. 2011. Вып. 6. С. 156–161.
2. ГОСТ Р 53244-2008. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. М.: Стандартинформ, 2009. 61 с.
3. Сочивко Д.Г. и др. Стохастическое моделирование кинетических кривых полимеразной цепной реакции // Доклады Академии наук. 2011. Т. 439. № 5. С. 696–699.
4. Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию (выданные Федеральной службой, включая Управление): <http://fp.crc.ru/gosregfr/>.
5. James C. GM Crops: Global Status of Commercialized Biotech. ISAAA Brief № 49. Ithaca, NY, 2014.
6. JRC. Event-specific method for the quantification of maize line 5307 using real-time PCR. Validation report, 2014.
7. JRC. Event-specific method for the quantification of maize line MON89034 using real-time PCR. Protocol, 2008.
8. Kumar P.A., Malik V.S., Sharma, R.P. The Insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* // Adv. Appl. Microbiol. 1996. Vol. 42. P. 1-43.
9. Wu Y. et al. Development of a general method for detection and quantification of the P35S promoter based on assessment of existing methods. Sci. Rep. 4, 7358; DOI:10.1038/srep07358 (2014).

THE DEVELOPMENT OF REAGENTS SET FOR DETECTION DNA OF GENETICALLY MODIFIED MAIZE LINES 5307 AND MON89034 BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD

M.V. MOISEEVA^{1,2}, E.YU. BUKINA², YA.I. ALEKSEEV¹,
E.V. BELENOVICH¹, O.V. KUZUBOVA¹,
D.A. VARLAMOV^{1,2}, E.S. MAZURIN¹, P.N. KHARCHENKO¹

(¹ All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology;
² Closed Joint Stock Company «Syntol»)

In the Russian Federation any food containing more than 0.9% DNA of genetically modified organisms (GMO) have to be specially labeled. The most widely used reference method for GMO detection is real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). Two real-time PCR kits for identification genetically modified maize lines 5307 and MON89034 permitted for use in food and feed in the Russian Federation since 2014 were designed.

Key words: real-time polymerase chain reaction, genetically modified organism, maize line 5307, maize line MON89034.

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

Букина Елена Юрьевна — науч. сотр. ЗАО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (499) 976-65-44).

Алексеев Яков Игоревич — врио директора ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», зав. лабораторией анализа ГМО (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (499) 976-65-44).

Беленович Екатерина Владимировна — науч. сотр. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (499) 976-65-44).

Кузубова Ольга Владимировна — к. б. н., ст. науч. сотр. ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (499) 976-65-44).

Варламов Дмитрий Александрович — ст. науч. сотр. ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (499) 976-65-44).

Мазурин Евгений Сергеевич — к. б. н., руководитель ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», зав. лаб. диагностики патогенов растений (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (499) 976-65-44).

Харченко Петр Николаевич — д. б. н., акад. РАН, науч. руководитель ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; тел.: (499) 976-65-44).

Moiseeva Mariya Viktorovna — junior researcher of All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, junior researcher of the closed joint stock company «Syntol» (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 42; tel.: +7 (495) 984-6993; email: maria.moiseeva92@gmail.com).

Bukina Elena Yurevna — researcher of the closed joint stock company «Syntol» (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 42; tel.: +7 (499) 976-65-44).

Alekseev Yakov Igorevich — temporarily appointed director of All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Head of the Laboratory of GMO Analysis (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 42; tel.: +7 (499) 976-65-44).

Belenovich Ekaterina Vladimirovna — research associate of All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 42; tel.: +7 (499) 976-65-44).

Kuzubova Olga Vladimirovna — PhD in Biology, senior researcher of the center of collective use «Biotechnology», All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 42; tel.: +7 (499) 976-65-44).

Varlamov Dmitriy Aleksandrovich — senior researcher of the center of collective use «Biotechnology», All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 42; tel.: +7 (499) 976-65-44).

Mazurin Evgeniy Sergeevich — PhD in Biology, Head of the center of collective use «Biotechnology», All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Head of the Laboratory of Diagnostics of Plants Pathogens (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 42; tel.: +7 (499) 976-65-44).

Kharchenko Petr Nikolaevich — Doctor of Biological Sciences, a member of Russian Academy of Sciences, scientific director of All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 42; tel.: +7 (499) 976-65-44).