

35S ПРОМОТОР ВИРУСА МОЗАИКИ НОРИЧНИКА (P-FMV) —
НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ АНАЛИЗА НА СОДЕРЖАНИЕ
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ

Я.И. АЛЕКСЕЕВ^{1,2}, Т.В. ХОТЯЙНЦЕВА², С.В. БОРОВСКАЯ^{1,2},
О.С. КОЛОБОВА^{1,2}, ДА. ВАРЛАМОВ^{1,2}, П.Н. ХАРЧЕНКО¹

О Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии;
² ЗАО «Синтол»)

Законодательство Российской Федерации устанавливает порог содержания генетически модифицированных организмов (ГМО) в пищевых продуктах и кормах, после которого требуется их обязательная маркировка, как 0,9%. В поточном анализе наиболее распространенным способом выявления ДНК ГМО является скрининг методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). В данной работе нами показано, что выбранная для анализа комбинация стандартного набора мишеней — 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S) и терминатора NOS *Agrobacterium tumefaciens* — является недостаточной для эффективного выявления широкого спектра линий ГМО. Нами были разработаны две новые тест-системы, обеспечивающие возможность выявления ДНК 358-промотора вируса мозаики норичника (P-FMV) в качестве дополнительной мишени для скрининга.

Ключевые слова: анализ генетически модифицированных организмов, промотор вируса мозаики норичника, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Благодаря развитию технологий генетической инженерии в мире ежегодно появляются новые линии генетически модифицированных организмов (ГМО). Объем выращиваемых трансгенных культур неуклонно растет, несмотря на опасения, вызванные недостаточной изученностью влияния ГМО на здоровье людей и окружающую природу. В настоящее время во многих странах, в т.ч. в России, введена обязательная маркировка пищевой продукции, гарантирующая потребителю выбор между продукцией, содержащей и не содержащей ГМО.

Тест-системы для скрининга ДНК ГМО-методом ПЦР-РВ, распространенные на сегодняшний день, выявляют ДНК стандартного набора мишеней — 358-промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S) и терминатора NOS *Agrobacterium tumefaciens* [1, 2]. Однако в последнее время в мире начали промышленно выращивать линии ГМ-растений, не содержащие этих регуляторных элементов. Для выявления ДНК таких ГМ-растений имеющиеся тест-системы необходимо усовершенствовать [6].

По состоянию на 2011 г., в России разрешены к использованию 17 линий трансгенных растений [7]. Регуляторные последовательности и гены трансгенных вставок этих линий перечислены в таблице.

Как видно из таблицы, две из разрешенных линий, а именно соя MON89788 и сахарная свекла Н7-1, не содержат ни промотора CaMV 35S, ни терминатора NOS, но содержат промотор вируса мозаики норичника (P-FMV). Кроме того, этот же промотор содержится в линиях ГМ-картофеля Луговской 1210 amk и Елизавета 2904/1 kgs, а также в следующих промышленно выращиваемых ГМО: рапсе линии

**Регуляторные последовательности и гены трансгенных вставок линий,
разрешенных для применения в пищевых продуктах
и кормах на территории Российской Федерации**

Растение	Линия	Производитель	Промотор	Ген	Терминатор
Соя	GTS4032	Monsanto, США	CaMV E35S	CP4 EPSPS	NOS
	A2704-12	Bayer CropScience, Германия	CaMV 35S	Pat	CaMV 35S
	A5547-127	Bayer CropScience, Германия	CaMV 35S	Pat	CaMV 35S
	MON89788	Monsanto, США	P-FMV/ TSF1	CP4 EPEPS	T-E9
Кукуруза	MON810	Monsanto, США	CaMV E35S	Cry1Ab	—
	MON863	Monsanto, США	4AS1, CaMV E35S	Cry3Bb1, nptII	tahsp17, NOS
	NK603	Monsanto, США	CaMV35S, ract	CP4 EPEPS	NOS
	MON88017	Monsanto, США	CaMV35S, ract	CP4 EPEPS, Cry3Bb1	NOS, tahsp 17
	GA21	Monsanto, США	ract	mEPSPS	NOS
	BT11	Syngenta Crop Protection AG, Швейцария	CaMV35S	Cry1Ab, pat	NOS
	MIR604	Syngenta Crop Protection AG, Швейцария	MTL ZmUbiInt	mCry3A, mpi	NOS
	T25	Bayer CropScience, Германия	CaMV 35S	pat	CaMV 35S
	3272	Syngenta Seeds Inc, США	GZein ZmUbiInt	taa, mpi	CaMV 35S, NOS
Картофель	Луговской 1210 amk	Центр Биоинженерии РАН	P-FMV	Cry3A	E9, NOS
	Елизавета 2904/1 kgs	Центр Биоинженерии РАН	P-FMV	Cry3A	E9, NOS
Рис	LLRICE62	Bayer CropScience, Германия	CaMV 35S	bar	CaMV 35S
Сахарная свекла	H7-1	Monsanto, США	P-FMV	CP4 EPSPS	rbcS E9

GT73, картофеле линии RBMT21-129, RBMT21-350, RBMT22-082; RBMT15-101, SEMT1502, SEMT1515, сахарной свекле линии GTSB77; томате линии CGN-89322-3 (8338), кукурузе линии MON89034; хлопке линии MON-1445-2, MON88913.

Вирус мозаики норичника является каулимовирусом из группы параретровирусов и подобен вирусу мозаики цветной капусты (*cauliflower mosaic virus*, CaMV). В 1989 г. было проведено клонирование последовательности P-FMV-промотора, аналогичной последовательности 35S CaMV-промотора. Была подтверждена конститу-

тивность промотора P-FMV во всех растительных тканях [1]. Было показано, что его сила равна, а в некоторых случаях превышает таковую промотора CaMV 35S и значительно превышает силу промотора NOS. Промотор P-FMV содержит два энхансера, элиминация одного из которых снижает его активность на 75% [2]. Эффективность промотора была доказана в экспериментах по трансформации табака, картофеля, сои, петунии, хлопка, рапса, люцерны и других растений. В настоящее время промотор P-FMV является широко используемой альтернативой промотору CaMV 35S в генной инженерии с.-х. культур [3—5].

Материалы и методы

Так как регуляторные последовательности, используемые в генной инженерии, часто подвергаются модификациям, было проведено сравнение нуклеотидных последовательностей трансгенных линий, содержащих промотор P-FMV. Были подобраны праймеры и зонд для ГЦР в реальном времени (ГЦР-РВ), специфичные общему для линий рапса GT73, кукурузы MON89034 и сои MON89788 фрагменту ДНК-промотора (рис. 1).

В качестве матрицы для проведения ГЦР-РВ анализа была использована ДНК, выделенная с помощью набора «Сорб-ГМО-Б» (ГНУ ВНИИСБ, Россельхозакадемии) из стандартного образца, содержащего более 994,4 г/кг ГМ-соеи линии MON89788 производства компании AOCS, США.

Результаты

На рисунке 2 показаны результаты ГЦР-РВ-анализа серии 10-кратных разведений образца этой ДНК, выделенной из стандартного образца ГМ-соеи линии MON89788.

GT73	GGAACTCCCATCCTCAAAGGTTTGTAAGGAAGAATTCTCAGTCCAAAGCCTCAACAAGGT
MON89034	GGAACTCCCATCCTCAAAGGTTTGTAAGGAAGAATTCTCAGTCCAAAGCCTCAACAAGGT
MON89788	-----GCTCGAGTGGGAAGCTAATTCTCAGTCCAAAGCCTCAACAAGGT *****
GT73	CAGGGTACAGAGTCTCCAAACCATTAGCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAAGAATCTTC
MON89034	CAGGGTACAGAGTCTCCAAACCATTAGCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAAGAATCTTC
MON89788	CAGGGTACAGAGTCTCCAAACCATTAGCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAAGAATCTTC *****
GT73	AATCAAAGTAAACTACTGTTCAGCACATGCATCATGGTCAGTAAGTTTCAGAAAAAGAC
MON89034	AATCAAAGTAAACTACTGTTCAGCACATGCATCATGGTCAGTAAGTTTCAGAAAAAGAC
MON89788	AATCAAAGTAAACTACTGTTCAGCACATGCATCATGGTCAGTAAGTTTCAGAAAAAGAC *****
GT73	ATCCACCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATCTTTGAAAGTAATCTTGTCAACATCGAGCA
MON89034	ATCCACCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATCTTTGAAAGTAATCTTGTCAACATCGAGCA
MON89788	ATCCACCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATCTTTGAAAGTAATCTTGTCAACATCGAGCA *****
GT73	GCTGGCTTGTGGGGACCAGACAAAAAAGGAATGGTGCAGAAATTGTTAGGCGCACCTACCA
MON89034	GCTGGCTTGTGGGGACCAGACAAAAAAGGAATGGTGCAGAAATTGTTAGGCGCACCTACCA
MON89788	GCTGGCTTGTGGGGACCAGACAAAAAAGGAATGGTGCAGAAATTGTTAGGCGCACCTACCA *****
GT73	AAAGCATCTTTGCSTTTATTGCAAAGATAAAGC-----
MON89034	AAAGCATCTTTGCSTTTATTGCAAAGATAAAGCAGATTCTCTAGTACAAAGTGGGGAACA
MON89788	AAAGCATCTTTGCSTTTATTGCAAAGATAAAGCAGATTCTCTAGTACAAAGTGGGGAACA *****

Рис. 1. Последовательности фрагментов промотора P-FMV общие для линий рапса GT73, кукурузы MQN89034 и сои MON89788.

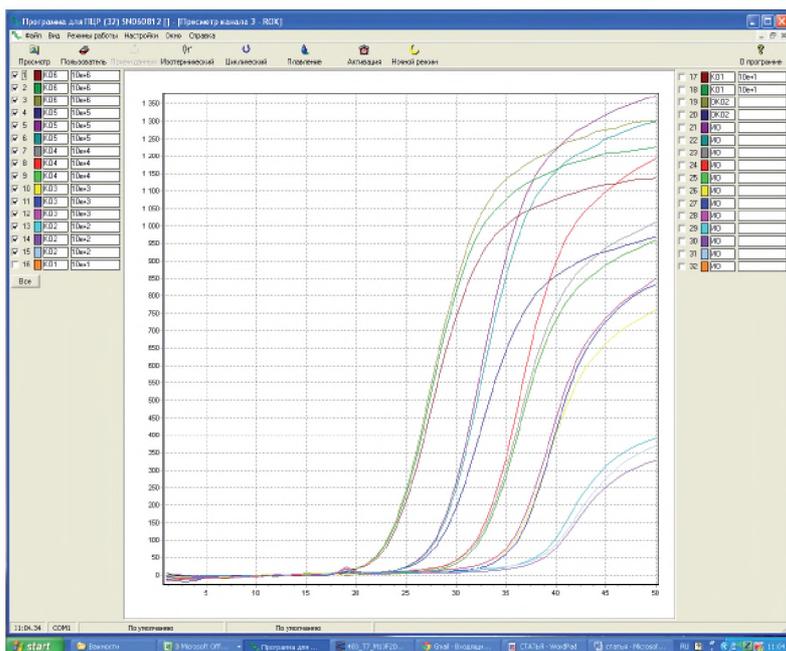


Рис. 2. Кинетические кривые серии 10-кратных разведений ДНК ГМ-линии сои MON89788, полученные на приборе для ПЦР-РВ АНК-32 (ИАП РАН, Санкт-Петербург)

Специфичность подобранных праймеров и зонда была исследована методом ПЦР-РВ на образцах ДНК, выделенных из ГМ-линий сои (A2704-12, A5547-35, GTS4032, MON89788), кукурузы (T25, Bt11, MON863, NK603, GA21, MIR604, MON88017, MON810) и риса (LLRICE62). Возрастание сигнала флуоресценции наблюдалось только в реакции с образцом ДНК, выделенной из сои линии MON89788, содержащей промотор P-FMV. Для всех остальных образцов возрастание сигнала флуоресценции не наблюдалось, что подтверждает высокую специфичность подобранных праймеров и зонда для ПЦР-РВ.

Ранее нами были разработаны тест-системы «Растение/358/NOS/BnK» и «Соя/358/NOS/BnK» для скрининга ГМО методом мультиплексной ПЦР-РВ. Данные тест-системы позволяют одновременно выявлять 4 различные ДНК-мишени в образце. Для расширения спектра выявляемых ГМО к имеющимся была добавлена реакция на пятую мишень — ДНК-фрагмент промотора P-FMV. Необходимо было изучить, скажется ли введение этой реакции на эффективность мультиплексной ПЦР-РВ. Для этого было проведено сравнение эффективности реакций в мультиплексной ПЦР-РВ с дополнительной реакцией детекции промотора P-FMV и без нее. Рассчитанные значения эффективностей реакций по каналу детекции промотора P-FMV составили 99% в случае тетраплексной ПЦР-РВ и 98% в случае пентаплексной ПЦР-РВ. При этом наблюдалось уменьшение значений пороговых циклов ($ACT=1$) по этому каналу.

Полученные результаты позволили создать две новые тест-системы для расширенного скрининга ГМО. В обеих тест-системах по каналу ROX проводится одновременная детекция двух мишеней: фрагментов ДНК CaMV 358-промотора и P-FMV-промотора. Кроме того, в тест-системе «PacTeHHe/35S+FMV/NOS-BnK» по каналу

FAM детектируется наличие в анализируемом образце ДНК-терминатора NOS, по каналу Я6С-фрагмента гена NADH-дегидрогеназы (референсная реакция для определения содержания растительной ДНК в образце), по каналу Cy5 — реакция внутреннего положительного контроля (ВПК), позволяющая избежать ложноотрицательных результатов анализа. Аналогичный состав имеет тест-система «Соя/35 S+FMV/NOS-ВПК», за исключением того, что по каналу R6G детектируется наличие в образце ДНК-фрагмента гена лектина сои.

На рисунке 3 приведен пример работы тест-системы «Сon/35S+FMV/NOS-BriK» на серии 10-кратных разведений смеси ДНК сои линии MON89788 и сои линии GTS4032 по 4 каналам детекции. Для анализа кинетических кривых ПЦР применяли аппроксимацию рекурсивными функциями [8], что позволяет повысить точность количественного анализа. Зависимость значения порогового цикла от логарифма концентрации хорошо описывается линейной функцией, при этом рассчитанный с помощью метода наименьших квадратов коэффициент корреляции R^2 составил 0,9998. Предел детекции тест-систем составляет 10 копий ДНК мишени в реакционной смеси, что соответствует менее чем 0,01% содержания ДНК ГМО в образце.

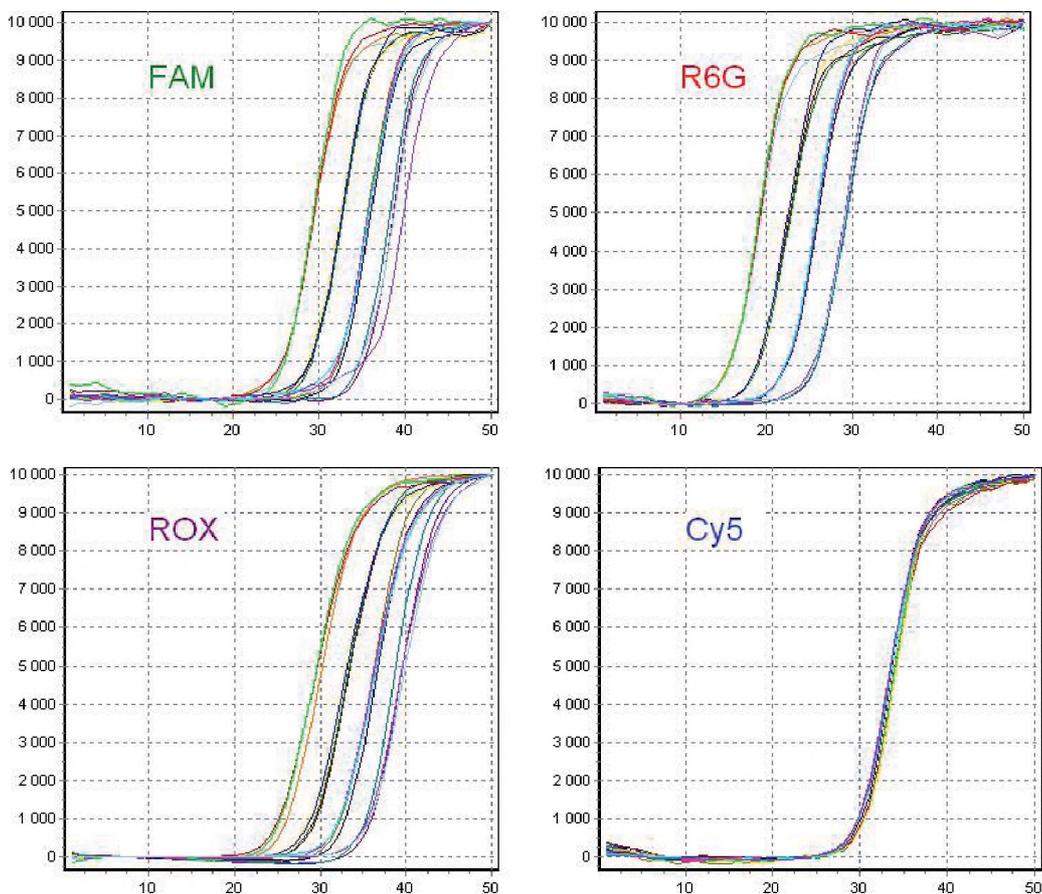


Рис. 3. Результат ПЦР-РВ-анализа серии 10-кратных разведений смеси ДНК сои линии MON89788 и сои линии GTS4032 с помощью тест-системы «С³/35S+FMV/NOS-BriK»

Заклучение

Разработанные тест-системы «PacTeHHe/35S+FMV/NOS-BnK» и «C o я/3 5 S+F M V/NOS-BnK» позволяют обнаруживать все линии ГМО, разрешенные для применения в пищевых продуктах и кормах в России, а также существенно расширяют спектр обнаруживаемых линий ГМО, запрещенных к использованию на ее территории, но промышленно выращиваемых в мире.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» ГК № 16.552.11.7032 от 29 апреля 2011 г. на оборудовании ЦКП «ВНИИСБ».

Библиографический список

1. *Bahrdt C., Krech A.B., Wurza., Wulff D.* *IJ Biotechnol.*, 2011. Mar 10; 152 (1-2):58-62.
2. *Dorries H.H., Remus I., Gronewald A., Gronewald C., Berghof-Jciger K.* // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010. Mar; 396(6):2043-54.
3. *Ranjan R., Patro S., Kumari S., Kumar D., Dev N., Maiti L.B.* *II Anal. Bioanal. Chem.*, 2010. Mar.; 396 (6):2103-12.
4. *Samac D.A., Tesfave M., Dornbusch M., Saruul R, Temple S.J.* *Transgenic Res.*, 2004. Aug;13(4):349-61.
5. *Sanger M., Daubert S., Goodman R.M.* // *Plant Mol. Biol.*, 1990. 14:433 443.
6. *Waiblinger H.-U., Grohmann L., Mankertz J., Engelbert D., Pietsch K.* // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010. 396:2065-2072.
7. <http://fp.crc.ru/gosregfr/> Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию (выданные Федеральной службой, включая Управления).
8. *Сочицеко Д.Г., Фёдоров АА., Лавров В.В., Варламов ДА., Курочкин В.Е., Петров РВ.* *ДАН*, 2011. 439(5): 696-699.

Рецензент — д. б. н. Г.И. Карлов

SUMMARY

Russian Federation regulations based on precautionary principle require any food containing more than 0.9% genetically modified organisms (GMO) to be specially labeled. In routine analysis, screening methods based on multiplex real-time PCR are most commonly used for the detection of GM plant material in food and feed. In this article, it is shown that the combination of two target sequences (CaMV 35S promoter and *Agrobacterium tumefaciens* NOS terminator) can not be used as a universal screening approach. Two GMO detection kits were designed, using 35S figwort mosaic virus promoter P-FMV as an additional target sequence.

Key words: genetically modified organisms detection, figwort mosaic virus promoter, real time polymerase chain reaction.

Алексеев Яков Игоревич — зав. лабораторией анализа ГМО ВНИИСБ, руководитель ЦКП ВНИИСБ, научный директор ЗАО «Синтол». Тел. (499) 977-74-55.

Эл. почта: jalex@iab.ac.ru.

Хотяинцева Татьяна Владимировна — научный сотрудник ЗАО «Синтол».

Эл. почта: Tatiana.khot@ginail.com.

Боровская Светлана Викторовна — научный сотрудник ВНИИСБ, научный сотрудник ЗАО «Синтол».

Колобова Ольга Сергеевна — старший научный сотрудник ВНИИСБ, научный сотрудник ЗАО «Синтол».

Варламов Дмитрий Александрович — старший научный сотрудник ВНИИСБ, ведущий научный сотрудник ЗАО «Синтол».

Харченко Петр Николаевич — чл.-корр. Россельхозакадемии, д.б.н., профессор, директор ВНИИСБ.