

Наука та інновації. 2009. Т. 5. № 2. С. 38–49.

**Я.В. Пірко^{1,2}, В.І. Корховий^{1,2}, Г.П. Кашеваров², І.К. Комарницький²,
П.А. Карпов^{1,2}, А.І. Ємець^{1,2}, М.В. Кучук², Б.В. Сорочинський^{1,2}, Я.Б. Блюм^{1,2}**

¹ Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України, Київ

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

ВПРОВАДЖЕННЯ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ КОМПОНЕНТІВУ НАСІННЄВОМУ МАТЕРІАЛІ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЇХ НОРМАТИВНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ



Розроблено та впроваджено методики якісної детекції генетично модифікованих (ГМ) сортів сої, ріпаку, цукрового буряку, кукурудзи та картоплі у насіннєвому матеріалі з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Здійснено дизайн та синтезовано комбінації олігонуклеотидних праймерів для тестування ГМ сортів вищезгаданих культур. Розроблені методичні рекомендації стосовно якісної детекції генетично модифікованого матеріалу у рослинній сировині.

К л ю ч о в і с л о в а: генетично модифіковані рослини, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), соя, ріпак, цукровий буряк, кукурудза, картопля.

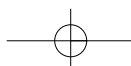
АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ

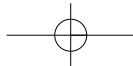
Закономірним підсумком бурхливого розвитку біотехнології і зокрема генетичної інженерії протягом останніх десятиліть стало широке впровадження у сільськогосподарське виробництво багатьох країн світу різноманітних генетично модифікованих (ГМ) сортів рослин [1, 2]. Останнім часом зусилля основних біотехнологічних корпорацій спрямовані на створення, реєстрацію нових ГМ ліній сільськогосподарських рослин та заохочення все ширшого кола фермерів до культивування їх на своїх угіддях. Згідно з інформацією Міжнародної служби з комерційного застосування агро-біотехнологічних культур (ISAAA) у 2007 р. ГМ рослини вирощували 23 країни на

загальній площі в 114,3 млн. га [2]. Як і у попередні роки, світовим лідером з культивування ГМ рослин продовжують залишатися США, де в 2007 р. трансгенні рослини вирощувалися на посівних площах 57,7 млн. га. За США ідуть Аргентина (площі посівів ГМ рослин у 2007 р. склали 19,1 млн. га), Бразилія (15 млн. га), Канада (7 млн. га), Індія (6,2 млн. га), Китай (3,8 млн. га), Парагвай (2,6 млн. га), ПАР (1,8 млн. га) та інші країни. У 2007 р. уже вісім країн ЄС вирощували ГМ сорти рослин на площах більше ніж 100 тис. га [2]. Безумовно, такі темпи росту сільськогосподарського вжитку ГМ культур призводитимуть у досить стислі терміни до значного зростання частки ринку генетично модифікованих організмів (ГМО) у світових масштабах.

Як вже відмічалось нами у попередній публікації [3], не зважаючи на той факт, що ГМ

© Я.В. ПІРКО, В.І. КОРХОВИЙ, Г.П. КАШЕВАРОВ,
І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ, П.А. КАРПОВ, А.І. ЄМЕЦЬ,
М.В. КУЧУК, Б.В. СОРОЧИНСЬКИЙ, Я.Б. БЛЮМ, 2009





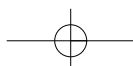
продукцію споживають сотні мільйонів людей у різних частинах світу, ставлення до неї залишається дещо обережним і настороженим. Тому багато країн, посилаючись, насамперед, на необхідність захисту прав споживачів, запровадили обов'язкове маркування ГМ продуктів (зокрема, країни Європейського Союзу, Російська Федерація тощо). На міжнародному рівні основним документом, який регламентує транскордонне переміщення ГМО, є Картахенський протокол про біобезпеку, підписаний Україною восени 2002 р. ще до набуття ним чинності [4]. Згідно з базовими положеннями цього документу всі ГМО, включаючи в першу чергу сільськогосподарську сировину, повинні супроводжуватися відповідним маркуванням для перетину кордонів держав-учасниць Картахенського протоколу та транзиту через їх територію.

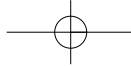
Відповідно прийняття минулого року Верховною Радою України Закону "Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів" актуалізує це питання, а Закон України "Про охорону прав споживача" прямо передбачає впровадження маркування ГМ продукції [3]. На жаль, і по сьогоднішній день в Україні відсутні чіткі "правила гри" щодо обігу ГМО на внутрішньому ринку, хоча формально, згідно з постановою Кабінету Міністрів № 985 від 1 серпня 2007 р., ввезення та реалізація харчових продуктів в Україні, що містять ГМО та їх компоненти у кількості більше, ніж 0,9 %, повинні здійснюватися за наявності відповідного маркування із зазначенням якісного складу таких продуктів. Вступ України до СОТ може збільшити надходження до нашої країни ГМО та продукції, виготовленої з їх використанням, що може викликати низку спірних питань у торговельних відносинах, особливо з тими країнами, які не є сторонами Картахенського протоколу (наприклад, США) або позиціонуються на світовому ринку сільськогосподарської продукції як потужні експортери (США, Канада, Аргентина, Бразилія та ін.). Вирішення таких питань потребувати-

ме належного відстеження руху товарних партій насіння та продуктів, які виготовлені з використанням ГМО, наявності апробованих і сертифікованих методів визначення якісного та кількісного вмісту ГМ компонентів (перш за все у рослинній сировині) та вміння ефективно їх використовувати [5].

Зрозуміло, що підставою для визнання наявності ГМ компонентів у рослинній сировині є різниця між ДНК немодифікованих та трансгенних рослин. Така різниця може бути виявлена завдяки детекції чужорідної ДНК, яка була штучно внесена до геному рослини, або нового білку, який є результатом експресії введеного гена. Якщо цей білок є ферментом, то для його ідентифікації можна використати хімічний аналіз для виявлення продукту ферментативної реакції, що ним каталізується. На сьогоднішній день існують два підходи, які широко застосовуються для детекції ГМ сортів рослин. Один з них — імуноферментний аналіз або ELISA (від Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), який базується на тестуванні наявності специфічних білків за рахунок реакції *антиген (білок)—антитіло* [6]. Інший підхід — полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, від PCR — Polymerase Chain Reaction), яка використовується для детекції послідовностей ДНК, введених до геному рослини [7]. Ці методи можуть бути застосовані як для ідентифікації наявності ГМ компонентів, так і для встановлення їх кількості у відповідних зразках. Саме метод визначення чужорідної ДНК, що базується на застосуванні ПЛР, був одним з перших, затверджених для офіційного використання на рівні ЄС [7]. В основу цього методу покладено виявлення регуляторних послідовностей, наприклад 35S-промотора та *nos*-термінатора, які фланкують введений ген [8].

Контроль генетично модифікованих компонентів у насінневому матеріалі сільськогосподарських культур є по суті першим етапом на шляху продукції до споживача. Саме цьому етапові повинна надаватися максимальна увага, оскільки інформація про вміст генетично модифікованих компонентів буде особливо





цінною безпосередньо для виробника продукції. В подальшому це дасть змогу йому формувати свою виробничу діяльність таким чином, щоб запобігти втрат при вирішенні спірних питань у споживчих ланцюгах від вихідної сировини до кінцевого продукту, який також може бути проаналізований на вміст ГМ інгредієнтів. Слід зазначити, що принципи визначення наявності ГМ компонентів за допомогою методів молекулярної генетики нами вже обговорювались, коли мова йшла про впровадження методів оцінки вмісту ГМ компонентів у продуктах харчування, кормах і парфюмерно-косметичних виробках [9]. Саме тому метою цього науково-технічного інноваційного проекту "Впровадження методів контролю вмісту генетично модифікованих компонентів у насіннево-му матеріалі сільськогосподарських культур та стандартизація їх нормативного забезпечення" (№ 0105U006036) стала розробка методик детекції чужорідної ДНК із застосуванням методу ПЛР у рослинному матеріалі, що може містити ГМ сорти сої, ріпаку, кукурудзи, цукрового буряку та картоплі, з метою подальшої передачі для впровадження та використання Державною службою з охорони прав на сорти рослин.

МЕТОДИЧНІ ОСНОВИ РОЗРОБКИ

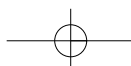
Для виявлення ГМ компонентів у рослинному матеріалі брали насіннєвий матеріал цукрового буряку, ріпаку, картоплі, сої. Контрольні та більшість дослідних зразків насіння сої, кукурудзи, ріпаку та цукрового буряку були надані Українським інститутом експертизи сортів рослин на умовах анонімності; референтні зразки сої та кукурудзи (Roundup Ready™ соя; кукурудза MON 810, Vt-11, Vt-176) — Інститутом референтних матеріалів та вимірів (Institute of Reference Materials and Measurements) Об'єднаного дослідницького центру ЄС (Joint Research Centre of the European Commission), Geel, Бельгія. Інколи як позитивний контроль брали плазмідну ДНК, що містила певний ген. У випадку картоплі для аналізу використовували бульби або калюсну

тканину з колеції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Насіння перемелювали на муку за допомогою блендера, а бульби або калюсну тканину картоплі до обробки відповідними буферами для екстракції ДНК перетирали у рідкому азоті.

Виділення тотальної ДНК з рослинного матеріалу

Для виділення та очистки ДНК використовується низка методів, вибір яких обумовлений вимогами до якості препаратів ДНК та специфікою об'єкту. Оскільки для успішного проведення ПЛР з метою якісної детекції ГМ рослинного матеріалу не завжди необхідні високоочищені препарати ДНК, то в деяких випадках припустимо використовувати спрощені, більш швидкі у вжитку методики виділення ДНК. При цьому допускається присутність в препаратах ДНК домішок, які суттєво не впливають на проведення ПЛР. Починаючи від часів піонерських робіт М. Кірбі (1956) [10] та Дж. Мармура (1961) [11], які заклали методичні основи виділення ДНК, було розроблено методики очищення ДНК, отриманої з рослинного матеріалу [12–16], у тому числі для фіксованих рослинних тканин [17] та протопластів [18]. На практиці ж, в основному, використовуються дві з них — із застосуванням для лізису клітин додецилсульфату натрію (ДДСН) або цетилтриметиламонію броміду (ЦТАБ), ефективність яких була апробована нами раніше [9]. У разі потреби виділення та очистки ДНК за допомогою ДДСН та ЦТАБ методів можна поєднати з обробкою зразка протеїназою К (або більш дешевою проназою) та РНКазою з хроматографією на гідроксиапатиті чи інших сорбентах, в тому числі і у мікроколоночному варіанті або з ультрацентрифугуванням в градієнті щільності CsCl.

Слід зазначити, що, як і в нашому випадку, більшість дослідників для виділення ДНК із рослинного матеріалу віддають перевагу ЦТАБ-методу. Це пов'язано з тим, що ЦТАБ дає можливість ефективно очищати ДНК від білків,



полісахаридів та РНК і ефективність очистки залежить від іонної сили розчину [19–22]. Детальні умови виділення ДНК можуть дещо відрізнятися в залежності від якості ЦТАБ різних виробників, через що інколи виникає потреба в їх корекції. Оскільки цей метод як базисний для розробки методів детекції ГМО рекомендує і Об'єднаний дослідницький центр (Joint Research Centre of the European Commission) ЄС в Іспрї (Італія) [7], саме його було покладено в основу цієї розробки. Для екстракції ДНК нами також використовувався набір GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma, США), що давало можливість значною мірою економити робочий час та запобігати контамінації зразків в процесі рутинного аналізу.

У подальшому виділену загальну ДНК використовували як матрицю для проведення ПЛР. Результати оцінки ДНК, виділеної із семи зразків сої та шести зразків цукрового буряка шляхом ампліфікації генів аспартамінотрансферази (для сої) і ацетолактатсинтази (для цукрового буряка) наведено на рис. 1 і 2. Послідовності відповідних пар праймерів, що використовувались у ході ПЛР, наведено в таблиці.

Електрофорез ампліфікованих фрагментів проводили згідно з [23] в 2%-ому агарозному гелі з використанням однократного трис-ацетатного буфера в присутності бромистого етидію. Було виявлено, що підібрані праймери ампліфікують фрагменти ДНК розміром 400 п.н. для сої і 650 п.н. для цукрового буряку відповідно. Виходячи з цих результатів, можна зробити висновок, що виділена з насінневого матеріалу ДНК є придатною для ампліфікації чужорідних генів.

Проведення ПЛР для детекції ГМ компонентів у насінневому матеріалі з наступним електрофоретичним аналізом продуктів ампліфікації

Виділену з усіх зразків рослинного матеріалу тотальну ДНК було використано для проведення ПЛР з метою детекції ГМ компонентів. Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: ДНК-матрицю — приблизно 50 нг (можна брати до 100 нг); по 0,2 (0,1–1) мкМ кожного з праймерів; 1–2 од. акт. *Taq* ДНК-полімерази (Sigma,

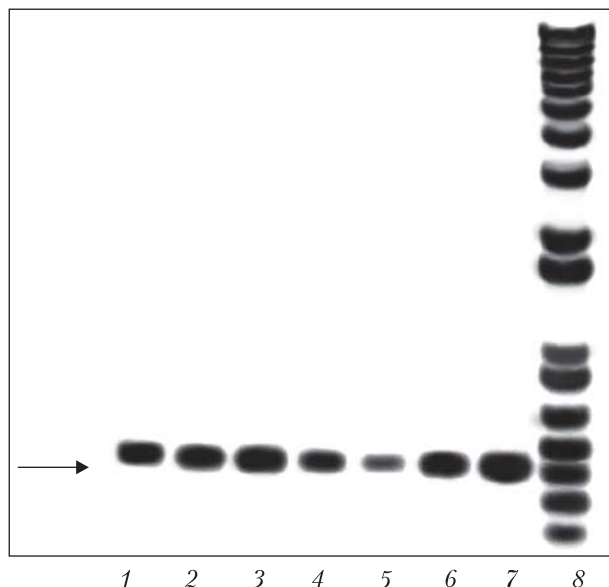


Рис. 1. Детекція внутрішнього стандарту (аспартамінотрансферази, *aat*) у різних сортів і ліній сої: 1–3 — анонімно відібрані лінії сої; 4 — сорт Amsoi 71; 5 — сорт Руно; 6 — сорт Офелія; 7 — лінія CV-3; 8 — ДНК-маркер, 100 п.н. Довжина амплікону — 400 п.н.

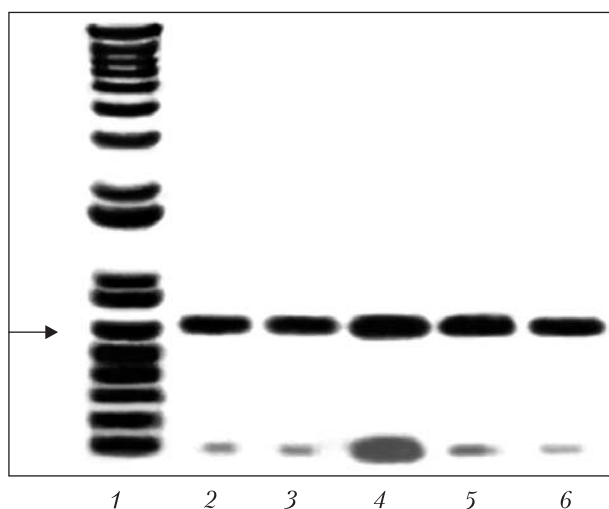
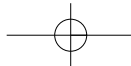


Рис. 2. Детекція внутрішнього стандарту (ацетолактатсинтази, *als*) у різних ліній цукрового буряку: 1 — ДНК-маркер, 100 п.н; 2 — Білоцерківська односім'янева; 3 — Ялтушківська 64; 4 — лінія 1389 P2; 5 — лінія ОІ К2; 6 — гібрид Межотненський 18. Довжина амплікону — 650 п.н.

США); 2,5 мкл 10-кратного буферу для полімерази (Promega, США); 0,1 (0,02–0,20) мМ кожного з dNTP (Perkin Elmer, США) та 2,5 мМ



Науково-технічні інноваційні проекти Національної академії наук України

Гени та нуклеотидні послідовності праймерів, що були використані для їх детекції

Ген	Праймери, 5'–3'	Довжина амплікону, п.н.
Ацетолактатсинтаза, <i>als</i>	ggtcaggttcagccacaatactc ggagactcgttagcccaaccaag	650
Аспаратамінотрансфераза, <i>aat</i>	tgctggagagaggggataaacaag actttgccccaggaaaatcgtc	400
CaMV 35S-промотор	gctcctacaatgccatca gatagtgggattgtgctca	195
<i>nos</i> -термінатор	gaatcctgttcgggtcttg ttatcctagttgctgcgcta	180
Фосфінотрицин-ацетилтрансфераза, <i>bar/pat</i>	atgctggcggctgcaccatc atgctggcggctgcaccatc atgagcccagaacgacgcccgc aatctcggtagcggcaggac	548
	gcaggaaccgaggagtgga agcccgatgacagcgaccac	264
	agattagccagctacagcagctgata gccttggaggagctggcaactcaaat	500
Фосфінотрицин-ацетилтрансфераза синтетична, <i>bar/pat</i>	atgtctccggagaggagaccagtt gcatgctcaggtcgactcaga	540
5-Єнолпіруват-шкімат-3-фосфат-синтаза, <i>epsps</i>	tgatgtgatattcactgacg tgtateccttgagccatgtgt	172
Bt-токсин, <i>CryIII</i>	taggatccgtcggagtcaacaaccttaggg taactagtctatttagttcactgggtagaactc	1000
Неоміцинфосфотрансфераза, <i>npt II</i>	cctgaatgaactccaggacaggca gctctagatccagagtcctcctcagaag	622
Bt-токсин, <i>CryIA(b)</i>	cgcgactggatcaggtacaac ttgaaaggtcagcggtagcagg	445

MgCl₂ (Promega, США). Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). Для ампліфікації фрагментів ДНК використовували праймери, нуклеотидні послідовності яких узагальнені у наведеній таблиці. Всі праймери були синтезовані у Центрі колективного користування унікальними приладами Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ на синтезаторі 3400 DNA Synthesizer (Applied Biosystems). Температурні умови ампліфікації та кількість циклів підбирали залежно від типу праймерів та кількості ДНК-матриці.

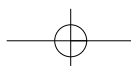
Розділення продуктів ампліфікації проводили за допомогою електрофорезу ДНК у 2%-ому агарозному гелі з використанням однократ-

ного трис-ацетатного або трис-боратного буферів в присутності бромистого етидію та одного з ДНК маркерів: Step Ladder, 50 п. н. (Sigma, США), EZ Load Molecular Ruler 100 п. н. PCR (BIO-RAD, США), 1kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL®, США), 1 kb DNA Ladder (Promega, США). Візуалізацію ампліконів у гелях проводили за допомогою транслюмінатора.

**ДЕТЕКЦІЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ
КОМПОНЕНТІВ У НАСІННЄВОМУ МАТЕРІАЛІ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР**

Аналіз сої та кукурудзи на вміст ГМ матеріалу

Одними з найбільш поширених регуляторних елементів у трансгенних сортів сої та кукурудзи є 35S промотор вірусу мозаїки цвіт-



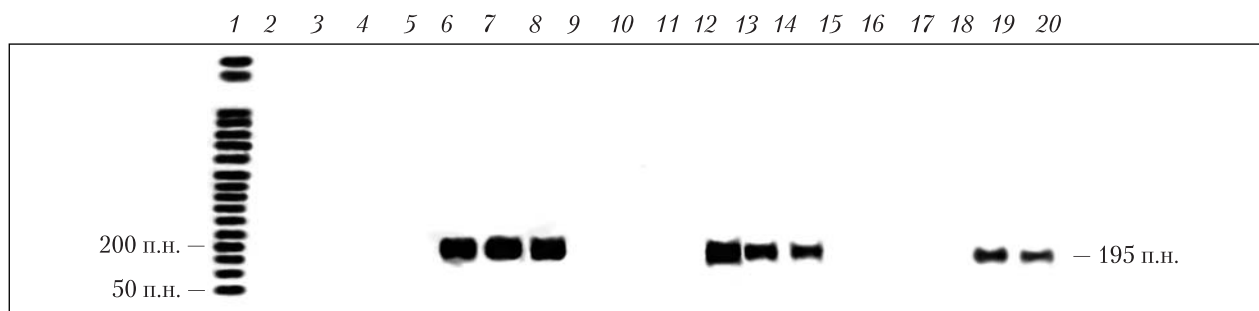
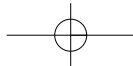


Рис. 3. Ідентифікація 35S промотора в ДНК сої та кукурудзи: 1 – ДНК-маркер, 50 п.н.; 2 – референтний зразок ERM BF410a, Roundup Ready™ соя (негативний контроль, неГМ соя); 3–18 – зразки сої; 19 – зразок кукурудзи; 20 – контроль (зразок без додавання рослинної ДНК). Довжина амплікону – 195 п.н.

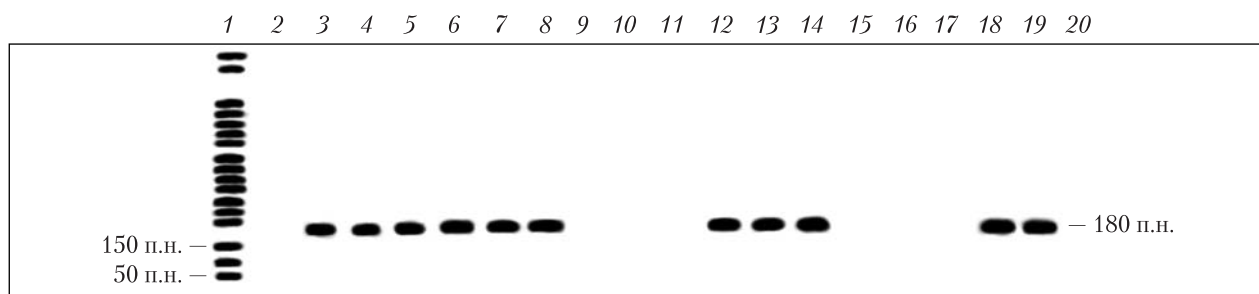


Рис. 4. Ідентифікація *nos*-термінатора в ДНК сої та кукурудзи: 1 – ДНК-маркер, 50 п.н.; 2 – референтний зразок ERM BF410a, Roundup Ready™ соя (негативний контроль, не ГМ соя); 3–18 – зразки сої; 19 – зразок кукурудзи; 20 – контроль (зразок без додавання рослинної ДНК). Довжина амплікону – 180 п.н.

ної капусти та *nos*-термінатор з *Agrobacterium tumefaciens* [8]. На рис. 3 та 4 наведені електрофореграми продуктів ампліфікації зразків ДНК тестованих сортів сої та кукурудзи з праймерами до 35S промотора та *nos*-термінатора.

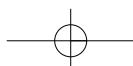
Наявність на електрофореграмах продуктів ампліфікації розміром 195 п.н. (для 35S промотора) та 180 п.н. (для *nos*-термінатора) дозволяє припустити, що зразки насіння сої під номерами 3–8, 12–14 та 18 можуть містити чужорідну ДНК. Одночасна ідентифікація присутності у зразках насіння сої 35S промотора та *nos*-термінатора робить можливим припущення, що в цих зразках присутня лінія сої GTS 40-3-2 (MON 40-3-2). Так само наявність вище зазначених генетичних елементів у перевірених зразках кукурудзи дає право на припущення, що досліджуваний зразок може містити домішки трансгенних сортів кукурудзи – NK 603 та MON 810.

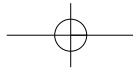
Ідентифікація *nos*-термінатора у зразках ріпаку та буряка

Для ідентифікації *nos*-термінатора у зразках ріпаку та буряка були використані ті ж самі праймери, що і для аналізу зразків сої та кукурудзи. Після ампліфікації проби використовували для проведення електрофорезу в 2%-ому агарозному гелі. Продукт ампліфікації – амплікон з довжиною 180 п.н. Результати електрофорезу, наведені на рис. 5, свідчать про наявність *nos*-термінатора у всіх досліджуваних зразках.

Детекція *pat/bar* гена в сої, цукровому буряку, кукурудзі та ріпаку

Відомо, що експресія гена *pat/bar*, який контролює синтез ферменту фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази, забезпечує стійкість трансгенних рослин до гербіциду фосфінотрицину. Ви-





Науково-технічні інноваційні проекти Національної академії наук України

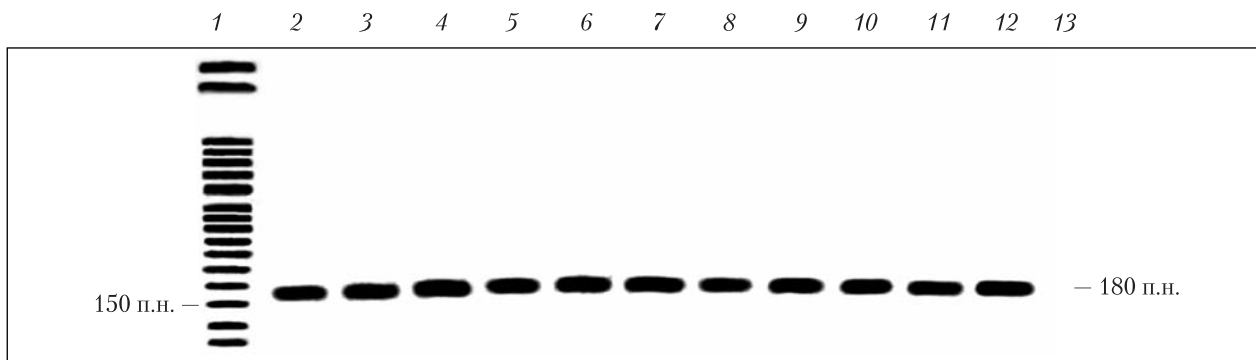


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ріпаку та буряку з праймерами до *nos*-термінатора: 1 – ДНК-маркер, 50 п.н.; 2–10 – зразки ріпаку; 11, 12 – буряк, зразки P2 та P5; 13 – контроль (зразок без додавання ДНК). Довжина амплікону – 180 п.н.

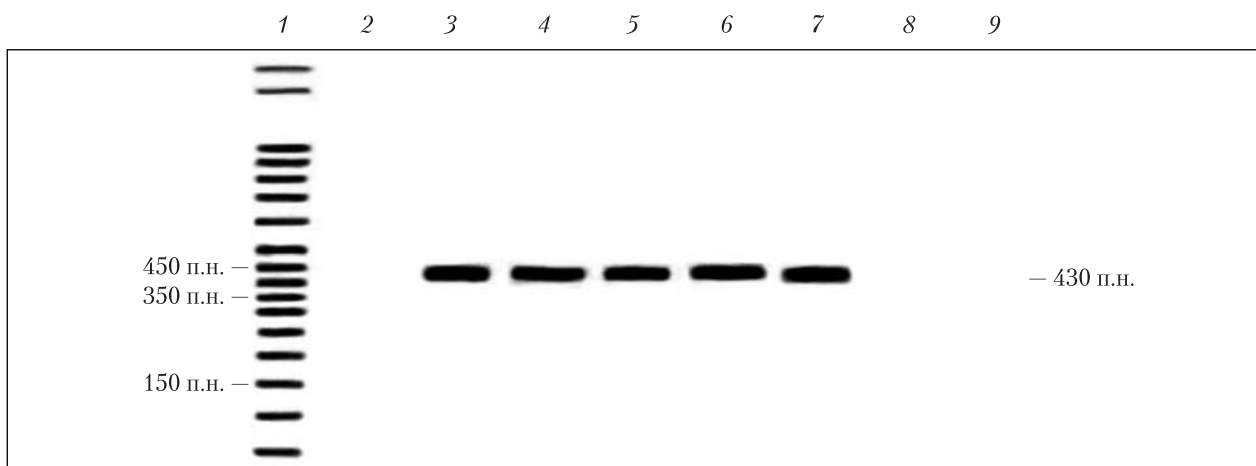


Рис. 6. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сої з праймерами до *bar* гена: 1 – ДНК-маркер, 50 п.н.; 2 – соя, референтний зразок ERM BF410a, Roundup Ready™ соя (негативний контроль, не ГМ соя); 3–7 – зразки сої; 8 – соя, референтний зразок ERM BF410f, Roundup Ready™ (ГМ соя); 9 – контроль (зразок без додавання ДНК). Довжина амплікону – 430 п.н.

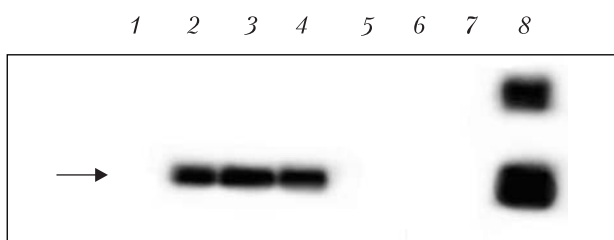
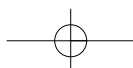
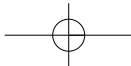


Рис. 7. Детекція *bar*-гена в зразках цукрового буряку: 1 – негативний контроль; 2–4 – ГМ лінії Білоцерківська односім'янева, Ялтушківська 64, Метошинський гібрид; 5 – лінія 1389 P2; 6 – лінія ОИ К2; 7 – зразок без додавання ДНК; 8 – позитивний контроль – плазмідна ДНК, що містить *bar* ген. Довжина амплікону – 548 п.н.

явлення ГМ компонентів, що містять *bar*-ген, у насінневому матеріалі проводили за допомогою декількох пар праймерів, сіквенс яких наведені в таблиці. Результати проведеного аналізу представлені на рис. 6–9. Зразки, що містять ГМ компоненти з *bar*-геном на електрофореграмах мають амплікони відповідної довжини.

Для детекції ГМ лінії кукурудзи Т25, яка містить синтетичний *bar/pat*-ген, було використано специфічну пару праймерів. Отримані результати продемонстрували, що ця пара праймерів ампліфікує фрагмент довжиною





540 п.н. у одного з двох тестованих зразків кукурудзи, тоді як у зразку ГМ кукурудзи Event 176 амплікону такого розміру не спостерігалося (рис. 10).

Ідентифікація гена 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтази (EPSPS) у ГМ сої

Експресія гена *epsps* у трансгенних рослин забезпечує їх стійкість до гербіциду гліфосату. Для встановлення наявності цього гена у зразках сої використовували таку пару праймерів: 5'-TGA TGT GAT ATC TCC ACT GAC G-3', 5'-TGT ATC CCT TGA GCC ATG TTG T-3'. Довжина амплікону складала 172 п.н. (рис. 11). Виходячи з даних, представлених на рисунку,

можна зробити висновок, що зразки сої під номерами 7–9 можуть містити ГМ матеріал, який відповідає сої Roundup Ready™ (Монсанто, США).

Виявлення гена Вt-токсину та гена неоміцинфосфотрансферази (*npt II*) у ГМ картоплі

Присутність гена Вt-токсину в зразках ДНК картоплі визначали за допомогою праймерів, що фланкують ділянку розміром 1 000 п.н. у кодуючій частині гена (див. таблицю). Паралельно проводили ампліфікацію з праймерами до нуклеотидної послідовності гена неоміцинфосфотрансферази (*npt II*). Довжина амплікону складає 622 п.н. Ген *npt II* як селективний



Рис. 8. Детекція *bar*-гена в зразках ріпаку та кукурудзи: 1 – ДНК-маркер, 50 п.н.; 2–10 – зразки ріпаку; 11 – кукурудза; 12 – контроль (без додавання ДНК). Довжина амплікону – 264 п.н.

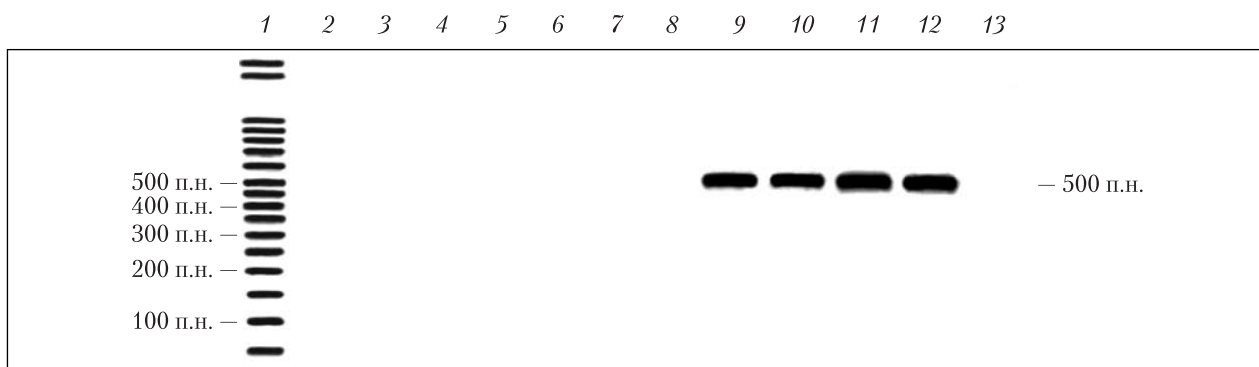
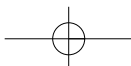


Рис. 9. Детекція *bar*-гена в зразках ріпаку, буряку та кукурудзи: 1 – ДНК-маркер, 50 п.н.; 2–7 – зразки ріпаку; 8–11 – зразки буряку; 12 – зразок кукурудзи; 13 – зразок без додавання ДНК. Довжина амплікону – 500 п.н.



входить до генетичної конструкції, що використовувалась для трансформації картоплі. Як видно з рис. 12 та 13, всі досліджувані зразки картоплі мають гени *Vt*-токсину та неоміцин-

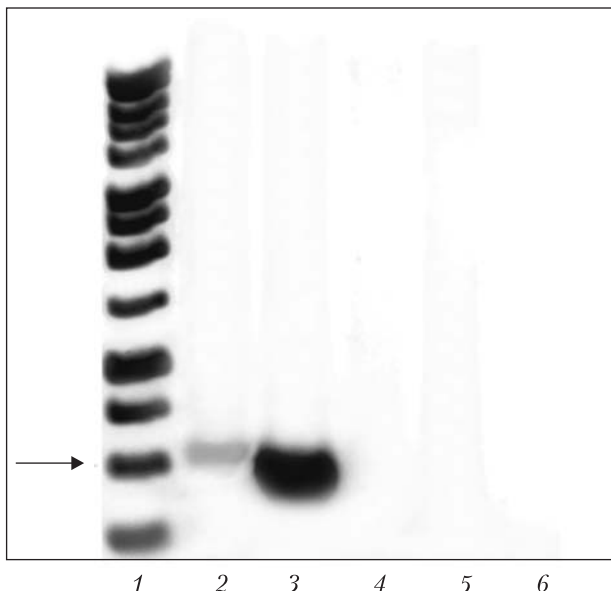


Рис. 10. Детекція синтетичного *bar*-гена в тестованих зразках кукурудзи: 1 – ДНК маркер, 100 bp; 2, 3 – зразки кукурудзи; 4 – негативний контроль (зразок, що не містить синтетичного *bar*-гена); 5 – позитивний контроль – стандарт борошна, отриманий з трансгенної кукурудзи (Event 176); 6 – зразок без додавання ДНК. Довжина амплікону – 540 п.н.

фосфотрансферази, в той же час амплікони довжиною 1 000 і 622 п.н. були відсутні у нетрансформованій картоплі (зразок 2).

Детекція *cryIA(b)*-гена у ГМ кукурудзи

Трансформація кукурудзи конструкцією, в якій присутній ген *cryIA(b)*, надає їй стійкості до кукурудзяного стеблового метелика (*Ostrinia nubilalis*). Для детекції *cryIA(b)*-гена в зразках кукурудзи була запропонована пара праймерів, за допомогою якої вдається ампліфікувати фрагмент розміром 445 п.н. (рис. 14). Показано, що цей амплікон присутній тільки у ДНК, ізольованій з борошна референтного зразка ГМ кукурудзи (Event 176). Він виявився відсутнім у всіх тестованих зразках кукурудзи.

ВИСНОВКИ

Таким чином, в результаті проведенних робіт у рамках науково-технічного інноваційного проекту "Впровадження методів контролю вмісту генетично модифікованих компонентів у насіннєвому матеріалі сільськогосподарських культур та стандартизація їх нормативного забезпечення" були відпрацьовані умови виділення ДНК з рослинних зразків, підібрані праймери для ідентифікації чужорідної ДНК у рослинній сировині, а також умови прове-

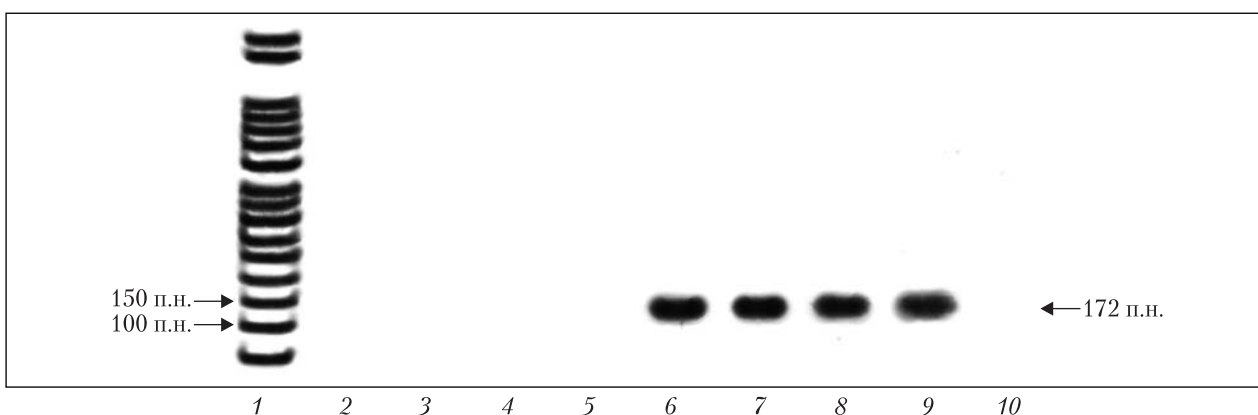


Рис. 11. Детекція *epsps*-гена у зразках сої: 1 – ДНК-маркер, 50 п.н.; 2 – соя, референтний зразок ERM BF410a, Roundup Ready™ соя (негативний контроль, не ГМ соя); 3–8 – невідомі зразки сої; 9 – соя, референтний зразок ERM BF410f, Roundup Ready™ соя (ГМ); 10 – контроль (без додавання ДНК). Довжина амплікону – 172 п.н.

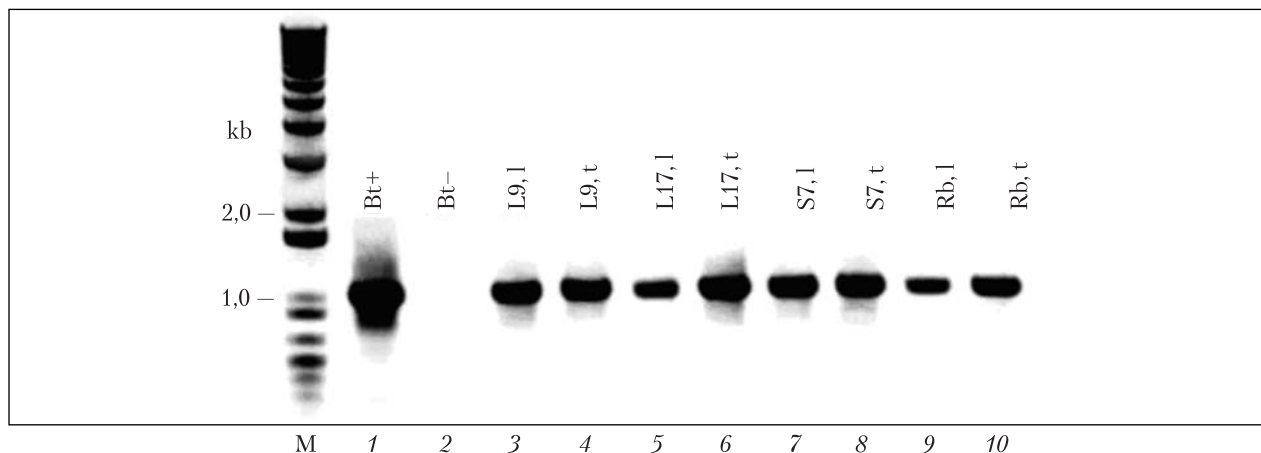
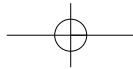


Рис. 12. Детекція гена Bt-токсину методом ПЛР: М – ДНК маркер; 1 – ДНК з геном Bt-токсину (Bt+), 2 – ДНК нетрансформованої картоплі (Bt-); 3–10 – досліджувані зразки ДНК картоплі (L9, L17 – сорт Луговської, S7 – сорт Слав'янка, Rb – сорт Russet Burbank; l – зелене листя, t – мікробульби). Довжина амплікону – 1 000 п.н.

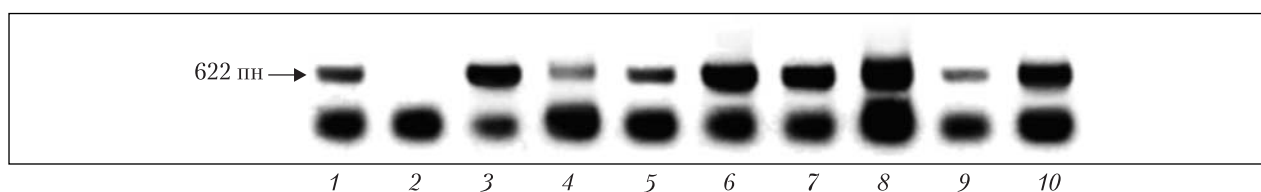


Рис. 13. Детекція гена неоміцинфосфотрансферази, *npt*: 1 – контрольна ДНК з геном Bt-токсину (Bt+), 2 – ДНК нетрансформованої картоплі (Bt-); 3–10 – досліджувані зразки ДНК картоплі (L9, L17 – сорт Луговської, S7 – сорт Слав'янка, Rb – сорт Russet Burbank; l – зелене листя, t – мікробульби). Довжина амплікону – 622 п.н.

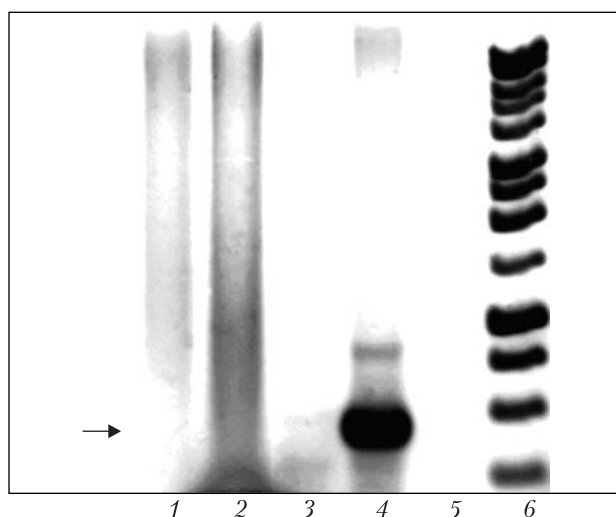
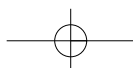
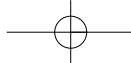


Рис. 14. Детекція *cryIA(b)*-гена в зразках кукурудзи: 1 та 2 – невідомі зразки кукурудзи; 3 – негативний контроль (не ГМ кукурудза), 4 – позитивний контроль – стандарт борошна, отриманого з трансгенної кукурудзи (Event 176); 5 – зразок без додавання ДНК; 6 – ДНК маркер. Довжина амплікону – 445 п.н.

дення ПЛР та візуалізації ампліконів за допомогою електрофорезу ДНК, що дає можливість ефективно детектувати чужорідні гени у комерційних сортах трансгенних рослин, які можуть потрапляти до України або знаходитись в обігу на внутрішньому ринку. Розроблені та апробовані методики були передані до Державної служби України з охорони прав на сорти рослин для тестування вітчизняного та імпортованого насінневого матеріалу основних сільськогосподарських культур (цукровий буряк, соя, ріпак, картопля та кукурудза) на наявність в них генетично модифікованих компонентів.

Слід зауважити, що суттєву роль у точності детекції ГМ компонентів у товарних партіях рослинної сировини (насіння) можуть відігравати методики відбору проб з відповідних партій. Але це питання потребує окремого розгляду і може бути предметом нас-

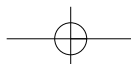


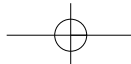


тупних науково-технічних розробок, так само, як і впровадження методів кількісної детекції ГМО.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Brookes G., Barfoot P.* GM Crops: The first ten years – Global socio-economic and environmental impacts. ISAAA Briefs. – 2006. – № 36 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications: Ithaca, New York).
2. *James C.* Global status of commercialized biotech/GM crops: 2007. ISAAA – 2007. – N 37 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications: Ithaca, New York). – 143 p.
3. *Blume Ya.B., Sorochinsky B.V.* Scientific knowledge as a tool to change the attitude of public perception of GMO. GMO-phobia or GMO-bacchanaly in Ukraine? // *Biotechnol. and Biotechnol. Eq.* – 2008. – V. 22, N 2. – P. 641–643.
4. Закон України "Про приєднання України до Картахенського протоколу про біобезпеку до Конвенції про біологічне різноманіття" від 12 вересня 2002р. № 152-IV // *Відомості Верховної Ради.* – 2002. – № 44. – С. 230.
5. *Zel J., Mazzara M., Savini C., Cordeil S., Camloh M., Stebih D., Cankar K., Gruden K., Morisset D., Van den Eede G.* Method validation and quality management in the flexible scope of accreditation: An example of laboratories testing for genetically modified organisms // *Food Anal. Methods.* – 2008. – Vol. 1, N 2. – P. 61–72.
6. *Van den Bulcke M., De Schrijver A., De Bernardi D., Devos Y., MbongoMbella G., Leunda Casi A., Moens W., Sneyers M.* Detection of genetically modified plant products by protein strip testing: an evaluation of real-life samples // *Eur. Food Res. Technol.* – 2007. – Vol 225. – P. 49–57.
7. *Querci M., Jermini M., Van den Eede G.* The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms – User Manual. – Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. – 2006. – 229 p.
8. *Pietsch K., Waiblinger H.U., Brodmann P., Wurz A.* Screeningverfahren zur Identifizierung "gentechnisch veränderter" pflanzlicher Lebensmittel // *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* – 1997. – Vol. 93, N 2. – P. 35–38.
9. *Блюм Я.Б., Банникова М.О., Картов П.А., Комарницький І.К., Кучук М.В., Сорочинський Б.В.* Впровадження методів оцінки наявності та вмісту генетично модифікованих компонентів у продуктах харчування, кормах і парфюмерно-косметичних виробках // *Наука та інновації.* – 2008. – Т. 4, № 2. – С. 40–48.
10. *Kirby K.* A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein // *Biochem. J.* – 1957. – Vol. 66, N 3. – P. 495–504.
11. *Marmur J.* A procedure for isolation of DNA from microorganisms // *J. Mol. Biol.* – 1961. – Vol. 3. – P. 209–219.
12. *Лобов В.П., Даскалюк А.П., Скрипка Л.В.* Выделение нативной ДНК из клубней картофеля и ее свойства // *Физиол. и биохимия культурных растений*, 1976. – Т. 8, вып. 4. – С. 429–431.
13. *Мирошниченко Г.П., Дьяченко Л.Ф.* Современные методы выделения ДНК из высших растений. – *Успехи совр. биол.* – 1981. – Т. 91, вып. 1. – С. 49–60.
14. *Сиволан Ю.М.* (Ред.) Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (Научно-методическое руководство). – К.: Аграрная наука, 1998. – 156 с.
15. *Сулимова Г.Е., Слюсаренко А.Г.* Выделение дезоксирибонуклеиновых кислот из тканей высших растений // В кн.: *Строение ДНК и положение организмов в системе.* – М.: МГУ, 1972. – С. 19–34.
16. *Сулимова Г.Е., Дрождежок А.Н., Ванюшин Б.Ф.* Выделение и очистка ДНК из высших растений с помощью бромистого цетилтриметиламмония в сочетании с хроматографией на оксиапатите // *Биоорганическая химия.* – 1976. – Т. 2, № 9. – С. 1182–1187.
17. *Антонов А.С., Владыченская Н.С., Петров Н.Б.* Выделение препаратов ДНК из тканей безпозвоночных животных и высших растений, фиксированных спиртом // *Биол. науки.* – 1971. – № 8. – С. 137–142.
18. *Глеба Ю.Ю., Шведкая Л.Г., Бутенко Р.Г., Сытник К.М.* Культура изолированных протопластов // *Физиол. растений.* – 1974. – Т. 21, вып. 3. – С. 598–605.
19. *Murray M.G., Thompson W.F.* Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucl. Acids Res.* – 1980. – Vol. 8, № 19. – P. 4321–4325.
20. *Нактинис В.И.* Два простых метода выделения ДНК из различных источников с применением цетавлона // *Биохимия.* – 1977. – Т. 42, №. 10. – С. 1783–1790.
21. *Doyle J.J., Doyle J.L.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* – 1987. – № 19. – P. 11–15.
22. *Doyle J.J.* DNA protocols for plants // In: *Molecular Techniques in Taxonomy* / G. Hewitt, A.W. B. Johnson, and J.P.W. Young, Eds. – NATO ASI Series H, Cell Biology, Vol. 57. – 1991. – P. 283–293.
23. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press. – 1989.





*Я.В. Пирко, В.И. Корховой, Г.П. Кашеваров,
И.К. Комарницкий, П.А. Карпов, А.И. Емец, Н.В. Кучук,
Б.В. Сорочинский, Я.Б. Блюм*

**ВНЕДРЕНИЕ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
КОМПОНЕНТОВ В СЕМЕННОМ
МАТЕРИАЛЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
КУЛЬТУР И СТАНДАРТИЗАЦИЯ
ИХ НОРМАТИВНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ**

Разработаны и внедрены методики детекции генетически модифицированных (ГМ) сортов сои, рапса, сахарной свеклы, кукурузы и картофеля в семенном материале с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Осуществлен дизайн и синтезированы комбинации олигонуклеотидных праймеров для тестирования ГМ сортов вышеупомянутых культур. Разработаны методические рекомендации относительно качественной детекции генетически модифицированного материала в растительном сырье.

Ключевые слова: генетически модифицированные растения, полимеразная цепная реакция, соя, рапс, кукуруза, сахарная свекла, картофель.

*Ya.V. Pirko, V.I. Korkhovy, G.P. Kashevarov,
I.K. Komarnitsky, P.A. Karpov, A.I. Yemets, M.V. Kuchuk,
B.V. Sorochinsky, Ya.B. Blume*

**INTRODUCTION OF THE METHODS
OF GENETICALLY MODIFIED COMPOUND
CONTROL IN SEED MATERIAL
OF AGRICULTURAL SPECIES AND
STANDARDIZATION OF THEIR
NORMATIVE PROVIDING**

Methods for the PCR detection of genetically modified soybean, rape, sugar beet and potato plant materials have been developed and introduced in practice. The sets of oligonucleotide primers available for testing of mentioned above cultivars have been designed and synthesized. The protocols to detect the genetically modified compounds in plant raw material have been proposed.

Key words: genetically modified plants, detection, polymerase chain reaction, soybean, rapeseed, corn, sugar beet, potato

Надійшла до редакції 26.06.08.

