

С.Б. Навроцький*, Ю.В. Панченко*, В.П. Васильєв*, Т.Г. Стасів**

*Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра органічної хімії,

** ДП “Івано-Франківськстандартметрологія”

ВИЯВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ОРГАНІЗМІВ У СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІЙ ПРОДУЦІЇ

© Навроцький С.Б., Панченко Ю.В., Васильєв В.П., Стасів Т.Г., 2012

Описано сучасну методику аналізу продукції на вміст ГМО та проведено відповідні аналізи на зірцях ріпаку та сої.

Ключові слова: виявлення ГМО, ГМ соя, ГМ ріпак, контроль ГМО.

We describe the modern method of the GMO analysis of the products and relevant tests conducted on models of rape and soybean.

Keywords: GMO detection, GM soybean, GM rape, GMO control.

Постановка проблеми

Сьогодні спостерігається стрімкий розвиток харчової промисловості за рахунок надбань біотехнологій, ключовим досягненням якої є створення генетично модифікованих організмів (ГМО). Відповідно до директиви ЄС 2001/18 від 12 березня 2001 року ГМО називаються організми, за винятком людських, генетичний матеріал яких було змінено неприродним шляхом, на відміну від схрещування або природної рекомбінації. Тобто, генетична модифікація відрізняється цілеспрямованою зміною генотипу організму на відміну від випадкової, яка характерна для природного мутагенезу. З одного боку, генетично модифіковані джерела їжі допомагають врятувати людство від голоду, отримати високі врожаї завдяки зниженню чутливості рослин до шкідників, мікроорганізмів, гербіцидів, надати продуктам харчування вищих споживних властивостей. З іншого боку, багато фахівців вважають, що на сучасному етапі розвитку біотехнології використання ГМО є передчасним і небезпечним. Це зумовлює необхідність у надійних та об'єктивних методах виявлення ГМО у сільськогосподарській продукції.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій

Першими кроками у створенні ГМО вважається розроблення у 60–70-ті рр. ХХ ст. основних методів генної інженерії – галузі молекулярної біології, доміантним завданням якої є конструювання *in vitro* нових функціонально активних генетичних структур і створення організмів з новими властивостями. Генна інженерія, крім теоретичних завдань, що полягають у вивченні структурно-функціональної організації генома різних організмів, вирішує безліч практичних задач. У 1983 р. вчені, вивчаючи ґрунтову бактерію, яка утворює на стовбурах дерев і чагарників нарости, виявили, що вона переносить фрагмент власної ДНК в ядро рослинної клітини, де він вбудовується в хромосому і розпізнається як власний.

З моменту цього відкриття і почалася історія генної інженерії. Ця наука одразу ж почала приносити свої плоди. Так, уже у 1986 р. було одержано першу вакцину проти гепатиту В. У тому ж році методом генної інженерії отримали інтерферон.

Перші генетично модифіковані рослини з'явилися у 1992 р. – це були помідори Flavr Savr – результат роботи компанії Calgene (США). Flavr Savr були стійкішими до гниття завдяки *PG* гену, який пригнічував діяльність ферментів полігалактуранози. Перші значні комерційні посіви генетично модифікованого насіння датуються 1996 р. у Сполучених Штатах Америки. У 2007 р. площі, засаджені генетично модифікованими рослинами, у США становили – 55,3 млн. га, в

Аргентині – 19,7 млн. га, в Бразилії – 13,3 млн. га, в Канаді – 6,6 млн. га, в Індії – 5,5 млн. га та в Китаї – 4,4 млн. га [1].

Асортимент генетично модифікованих рослин налічує велику кількість сортів і з кожним роком збільшується. Так, за даними 2009 р., у світі офіційно зареєстровано 220 сортів генетично модифікованих продуктів (табл. 1) [2].

Таблиця 1

Дані про сорти генетично модифікованих рослин, що впроваджені в промислове виробництво

Продукти	Кількість зареєстрованих сортів		Країни-виробники												
	Разом	З них допущено до використання в харчових цілях	США	Канада	Країни ЄС	Японія	Філіппіни	Бразилія	Аргентина	Австралія	Мексика	Уругвай	ПАР	Швейцарія	Китай
Кукурудза	44	36	27	24	17	28	24	–	9	–	–	2	3	1	9
Соя	16	7	6	6	3	7	1	1	1	3	1	1	1	–	1
Ріпак	22	12	12	12	11	12	1	–	–	6	–	–	–	–	10
Картопля	34	11	11	11	1	11	11	–	–	–	1	–	–	–	–
Рис	25	14	3	2	–	14	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Томати	20	13	9	4	6	2	–	–	–	–	1	–	–	–	1
Пшениця	8	8	1	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Буряк	3	3	3	2	1	3	2	–	–	1	–	–	–	–	–
Диня	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Гарбуз	3	2	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Цикорій	3	–	3	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Бавовник	18	15	1	9	4	15	7	1	–	–	–	–	–	–	1
Інші	19	6	2	4	5	9	1	–	–	–	–	–	–	–	1
Разом	220	113	80	78	51	101	47	2	10	10	3	3	4	1	23

З моменту створення генетично модифікованих організмів у наукових колах жваво обговорюють доцільність їхнього використання. Насамперед генетично модифіковані організми вводять до продовольчих культур з метою підвищення урожаїв, поживної цінності, стійкості до шкідників, зменшення часу росту та дозрівання культури. Такі маніпуляції є вигідними в економічному плані, оскільки потребують менших затрат агрохімікатів, палива та праці порівняно з традиційними культурами. Такі новації дають змогу щорічно збільшувати дохід ферм, що займаються вирощуванням генетично модифікованих рослин. Наприклад, дохід ферм з вирощування генетично модифікованої кукурудзи у США протягом 1997 – 2007 рр. стрімко зростав (рис. 1) [1].

Наведений вище графік підтверджує світові тенденції щодо доцільності використання ГМО. Однак, будь-яка технологія має як свої переваги, так і недоліки. Особливістю ГМО є те, що вони містять неприродний для себе (екзотичний) генетичний матеріал, який може спричинити перенесення такої екзотичної ДНК до інших представників того самого виду. Генетична структура таких організмів характеризується підвищеною нестабільністю, що може стати причиною індуктивного мутагенезу. Оскільки кількість копій і місць інтеграції генів контролювати доволі складно, то можлива активація різних мобільних елементів генома самого хазяїна. Крім того, вмонтовування нових генів може створювати нові міжгенні взаємодії, частина з яких може непрогнозовано реалізуватись у фенотипі.

Отже, всі фактори ризику, що пов'язані з культивуванням і вживанням ГМО, можна умовно поділити на три окремі групи: харчові, екологічні та агротехнічні.

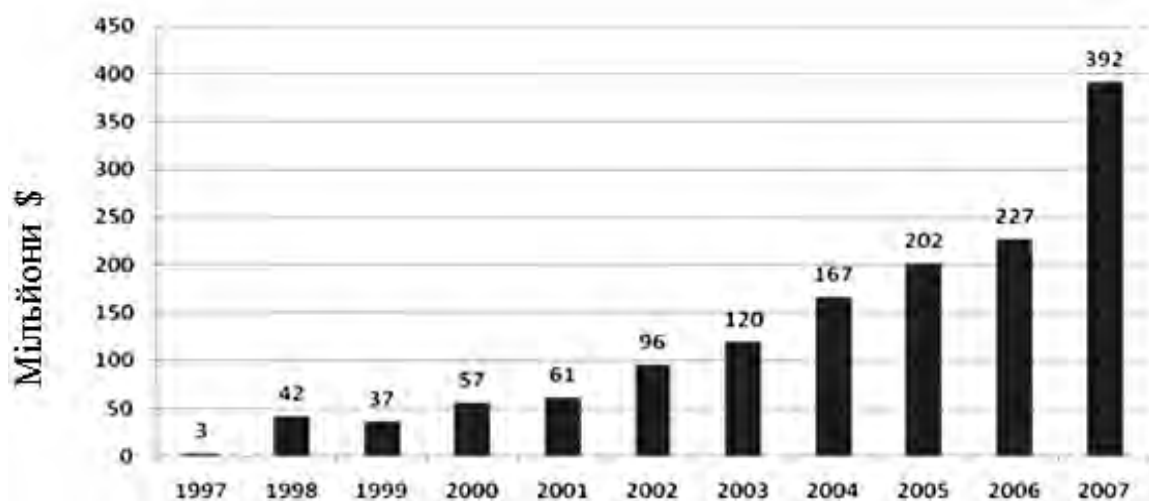


Рис. 1. Графік доходів фермерських господарств США, які вирощують генетично модифіковану кукурудзу

Харчові ризики зумовлені безпосередньою дією токсичних і алергічних трансгенних білків ГМО, а також безпосереднім плейотропним впливом трансгенних білків на метаболізм рослин. Важливим для дослідження є збільшення гербіцидів і їх метаболітів у стійких видах сільськогосподарських рослин та ризик горизонтального перенесення трансгенних конструкцій, насамперед у геном симбіотичних для людей і тварин бактерій (*E.coli*, *Lactobacillus (acidophilus, bifidus, bulgaricus, caucasicus)*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium*, тощо).

Екологічний ризик зокрема пов'язаний із зниженням сортової різноманітності сільськогосподарських культур у результаті масового використання ГМО, одержаних з обмеженої серії родинних сортів. Крім того, у зв'язку з неконтрольованим перенесенням конструкцій, особливо тих, що визначають різноманітний тип стійкості до пестицидів, шкідників і хвороб рослин, знижується біорізноманітність дикорослих предкових форм. Негативний вплив на біорізноманітність також спостерігається через ураження токсичними трансгенними білками нецільових комах і ґрунтової мікрофлори та порушення трофічних ланцюгів. Разом із тим, існує ризик неконтрольованого горизонтального перенесення конструкцій у ризосферну мікрофлору. Важливим також є ризик швидкого проявлення стійкості до трансгенних токсинів, що використовуються, у комах-фітофагів, бактерій, грибів та інших шкідників. Ще одним екологічним ризиком можна вважати виникнення нових, більш патогенних штамів фітовірусів за їх взаємодії з трансгенними конструкціями, що проявляють локальну нестабільність в геномі рослини-господаря і тим самим є найімовірнішою ціллю для рекомбінації з вірусною ДНК.

Агротехнічні ризики пов'язані із зміною нецільових властивостей і ознак модифікованих сортів, обумовлені плейотропною дією введеного гена. Наприклад, можливим є пониження стійкості до патогенів за зберігання і стійкості до критичних температур при вегетації у сортів, стійких до дії комах-шкідників. Імовірно також відтермінування зміни властивостей через декілька поколінь, пов'язане з адаптацією нового гена генома і з проявленням як нових плейотропних властивостей, так і зміни вже декларованих. Можлива також і неефективність трансгенної стійкості до шкідників через декілька років масового використання цього сорту. Водночас існує ризик використання виробниками термінальних технологій для монополізації виробництва насінного матеріалу [3].

Зважаючи на вищезазначені фактори у ст.3 Закону України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» № 1103-V від 31.05.2007 р., основними принципами державної політики в галузі ГМО є пріоритетність збереження здоров'я людини і охорони навколишнього природного середовища порівняно з отриманням економічних переваг від застосування ГМО та контроль за ввезенням на митну територію України ГМО та продукції, отриманої з їх використанням, їх реєстрацією та обігом.

Мета роботи – проведення якісного аналізу зрізів ріпаку та сої на вміст генетично модифікованих організмів.

Генетична конструкція ГМО виглядає так:

ДНК хазяїна	Промотор	ГЕН	Термінатор	Маркер	ДНК хазяїна
-------------	----------	-----	------------	--------	-------------

Передавання генетичної інформації починається з транскрипції. Транскрипція (від лат. *transcriptio* – переписування) – біосинтез РНК на матриці ДНК. Транскрипція регулюється за допомогою промотора та термінатора. Промотор (від лат. *promoveo* – стимулювати) – це послідовність нуклеотидів в молекулі ДНК, які відповідають за початок транскрипції. Найпоширеніші промотори: *35S CaMV*, *NOS*, *adh*. Термінатор – це послідовність нуклеотидів в молекулі ДНК, яка відповідає за закінчення транскрипції. Найпоширеніші термінатори: *NOS*, *35S CaMV*, *E9*. Ключовим елементом генетичної конструкції є відповідний ген, який відповідає за бажані ознаки. У більшості випадків в ГМО вмонтовують такі гени: *epsps*, *pat/bar*, *pat* – гени стійкості до гербіцидів, *CP4EPSPS* – ген стійкості до гліфосфату, *bar* – ген стійкості до фосфінотрицину, *cry* – гени стійкості до комах-шкідників. Генетична конструкція також обов'язково повинна містити маркерні гени – такі, як наприклад, *npt*, *npt II*, які дають змогу відрізнити у процесі створення генетично модифіковані організми від немодифікованих. У результаті комбінування різних елементів генетичної конструкції науковці отримують велику кількість ліній ГМО. Основні лінії ГМО та компанії, що їх впроваджують відповідно до МКУ 4.2.2304-07, наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Основні лінії ГМО та компанії-виробники

Лінія	Виробник	Гени	Промотори	Термінатори
Соя GTS 40-3-2	Monsanto, США	CP4EPSPS	CaMV E35S	NOS
Соя A2704-12	Bayer CropScience, Німеччина	pat	CaMV 35S	CaMV 35S
Соя A5547-127	Bayer CropScience, Німеччина	pat	CaMV 35S	CaMV 35S
Кукурудза MON863	Monsanto, США	Cry3Bb1 <i>npl</i>	4ASI CaMV 35S	tahsp17 NOS
Кукурудза NK603	Monsanto, США	CP4EPSPS	CaMV E35S Ract	NOS
Кукурудза MON88017	Monsanto, США	CP4EPSPS Cry3Bb1	Ract CaMV 35S	NOS tahsp17
Кукурудза Bt11	Syngenta Crop Protection AG, Швейцарія	Cry1 Ab pat	CaMV 35S	NOS
Кукурудза MIR604	Syngenta Crop Protection AG, Швейцарія	mCry3A pmi	MTL ZmUbiInt	NOS
Кукурудза T25	Bayer CropScience, Німеччина	pat	CaMV 35S	CaMV 35S
Картопля New Leaf Superior	Monsanto, США	cry3A nptII	CaMV E35S CaMV 35S	E 9 NOS
Картопля New Leaf Russet Burbank	Monsanto, США	cry3A nptII	CaMV E35S CaMV 35S	E 9 NOS
Рис LLRICE62	Aventis CropScience, Німеччина	bar	CaMV 35S	CaMV 35S
Буряк H7-1	Aventis CropScience, Німеччина	CP4EPSPS	FMV 35S	rbcS E9

Якісний аналіз сировини на вміст ГМО складається з трьох основних стадій: підготовка проби (гомогенізація), виділення ДНК, проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Гомогенізація необхідна для підвищення однорідності проби і збільшення виходу ДНК. Слід зазначити, що суха гомогенізація створює ризики контамінації через утворення пилу, тоді як рідка гомогенізація спричиняє звільнення і активізацію ДНК, що може привести до ферментної деградації ДНК, а то й до її повної втрати.

Ефективність методу ПЛР, як і інших методів аналізу ДНК, залежить від якості і чистоти виділеної ДНК. Якість ДНК визначається довжиною фрагментів і ступенем їх пошкодження під дією тепла, кислот та інших речовин, що викликають гідроліз чи ферментативну деградацію. Отже, якість ДНК може змінюватись залежно від вихідного матеріалу, ступеня його нативності та від методів екстрагування. Найпоширенішими є методи екстрагування ДНК за допомогою цетилтриметиламонійброміду (ЦТАБ), сорбентний метод та комбінація цих методів.

Загалом процес екстракції ДНК повинен містити такі стадії:

1. Руйнування кліткової стінки тканин.
2. Руйнування кліткової мембрани за допомогою детергенту.
3. Інактивація ендогенних нуклеаз за допомогою детергенту та етилендіамінтетраоцтової кислоти. При цьому зв'язуються іони Mg^{2+} , які є кофакторами багатьох нуклеаз. У деяких випадках для розщеплення білків додають протеазу К.
4. Відділення інгібуючих полісахаридів.
5. Видалення гідрофобних компонентів, ліпідів і поліфенолів.
6. Остаточне видалення детергенту і концентрування ДНК [4].

Ключовим етапом аналізу є проведення ПЛР, яка була відкрита в 1983 р. американським біохіміком Кері Маллісом. У 1993 р. Маллісон здобув Нобелівську премію з хімії за своє відкриття. ПЛР дає змогу ампліфікувати будь-яку ділянку ДНК за допомогою повторних циклів дублювання, які здійснює фермент ДНК-полімераза. Специфіка дії ДНК-полімерази пов'язана із здатністю зв'язуватись із одним ланцюжком ДНК, водночас синтезуючи інший, так створюючи подвійну спіраль. Однак, ДНК-полімераза мала суттєвий недолік – для розщеплення дволанцюгової молекули ДНК на окремі ланцюжки проводиться нагрівання до $95^{\circ}C$, коли фермент інактивується, тому його доводиться додавати після нагрівання на кожному циклі реакції, що призводить до значних затрат ензиму. Ця проблема примусила науковців пошукати термостійкіші ферменти. Одну з перших термостійких ДНК-полімераз було отримано від бактерій *Thermus aquaticus* і названо Таг-полімеразою. Із ферментами надзвичайно важливе значення у проведенні ПЛР мають короткі синтетичні олігонуклеотиди – так звані праймери. Праймери завдяки своїй комплементарності до одного з ланцюгів дволанцюгової матриці ДНК виділяють початок і кінець ділянки, яка ампліфікується.

Загалом типова ПЛР-ампліфікація складається з трьох реакцій: денатурації, ренатурації і синтезу. Денатурація є першим етапом ПЛР і проводиться витриманням взірця ДНК при температурі $95^{\circ}C$ протягом щонайменше однієї хвилини. Поряд з ДНК, в реакційній суміші міститься в надлишку два праймера, Таг-полімераза і чотири дезоксирибонуклеотиди. Під час ренатурації температура суміші повільно знижується до $55^{\circ}C$, і праймери з'єднуються з комплементарними ділянками ДНК. Завершальним етапом є синтез, при проведенні якого температуру підвищують до величини, оптимальної для дії ферменту Таг-полімераза $75^{\circ}C$. Починається синтез ДНК, ініційований 3-гідроксильною групою праймера [5].

Методика проведення досліджень

У результаті досліджень нами було здійснено якісний аналіз чотирьох взірців насіння ріпаку та чотирьох взірців сої. При підготовці взірців перемелювали за допомогою блендера і відбирали пробу масою 0,05–0,1 г (для вологих взірців наважка повинна становити 0,15–0,2 г).

Для виділення ДНК з насіння ріпаку використовували набір реактивів "Сорб-ГМО-Б". У наборі для очищення ДНК використовували кремнієвий сорбент, як лігуючий агент – детергент СТАВ, що забезпечує максимальний вихід ДНК з рослинних компонентів.

Проведення ПЛР у реальному часі здійснюється за допомогою аналізатора нуклеїнових кислот (АНК-32). Метод ПЛР у реальному часі заснований на детектуванні сигналу флуоресценції, що дає змогу спостерігати процес накопичення продуктів у ході реакції. Сигнал флуоресценції зростає пропорційно збільшенню кількості продукту ампліфікації у досліджуваному зразку.

Якісне визначення ГМО засноване на ідентифікації генетично модифікованих регуляторних послідовностей – як правило, це 35S-промотор і NOS-термінатор, які найпоширеніші у промислових генетично модифікованих культурах. У ході аналізу одночасно в одній пробірці проходять три незалежні реакції. Перша реакція дає змогу виявити фрагмент ДНК 35S-промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), який присутній у багатьох відомих вирощуваних в промислових масштабах генетично модифікованих рослинах. Друга реакція дає змогу виявити фрагмент ДНК-NOS термінатора T1 плазмиди *Agrobacterium tumefaciens*, який також присутній у багатьох промислово вирощуваних генетично модифікованих рослинах. Наявність позитивної динаміки для однієї або обох реакцій свідчить про наявність у зразку ДНК ГМО. Третя реакція – реакція внутрішнього позитивного контролю (ВПК) – дає змогу виключити помилково негативні результати. Проходження кожної з трьох реакцій детектується за допомогою специфічного зонда, який мічений заданим флуоресцентним барвником. Програма дає змогу контролювати хід реакції у всіх пробірках одночасно.

Після отримання достатніх даних виводили реальні графіки інтенсивності флуоресценції усіх пробірок для обраного барвника (рис. 2).

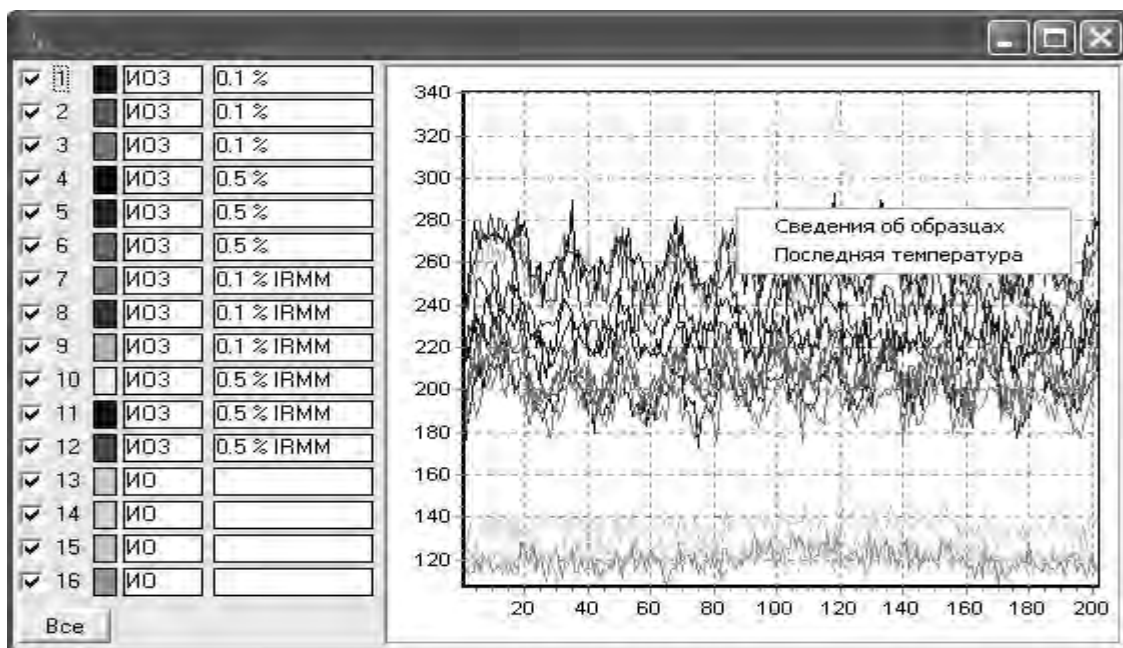


Рис. 2. Залежність флуоресценції від номеру циклу (вертикальна вісь – «Флуоресценція, відносні одиниці», горизонтальна вісь – «Номер циклу»)

Результати дослідження

При інтерпретації результатів завдяки програмному забезпеченню компанії «Синтол» дані з приладу АНК виводили на екран ПК у вигляді табл. 3, 4.

Таблиця 3

Результати аналізу зразків ріпаку

№ Назва	Ріпак		Pat		NOS _t		EPSP		Результат
	С _t (HEX)	виявлено	С _t (ROX)	виявлено	С _t FAM	виявлено	С _t (Cy5)	виявлено	
1.ПКО	29,05	+	29,09	+	28,8	+	28,11	+	Приймається
2.ОКО	≥50	-	≥50	-	≥50	-	≥50	-	Приймається
Проба№1	21,45	+	≥50	-	≥50	-	≥50	-	Не ГМ ріпак
Проба№2	21,45	+	≥50	-	≥50	-	≥50	-	Не ГМ ріпак
Проба№3	21,53	+	≥50	-	≥50	-	≥50	-	Не ГМ ріпак
Проба№4	21,59	+	≥50	-	≥50	-	≥50	-	Не ГМ ріпак

Результати аналізу зразків сої

№ Назва	Соя		П-35S		T-NOS		ВПК		Результат
	Ct (R6G)	виявлено	Ct (ROX)	виявлено	Ct (FAM)	виявлено	Ct (Cy5)	виявлено	
1.ПКО-С1	24,97	+	32,05	+	32,23	+	30,78	+	Приймається
2.ОКО	≥50	-	≥50	-	≥50	-	30,68	+	Приймається
Проба№1	21,42	+	≥50	-	≥50	-	30,8	-	Не ГМ соя
Проба№2	24,57	+	33,98	+	33,87	+	29,65	+	ГМ соя
Проба№3	25,97	+	34,26	+	34,75	+	31,06	+	ГМ соя
Проба№4	26,03	+	32,72	+	33,12	+	30,48	+	ГМ соя

ПКО і ОКО – це позитивний контрольний зразок та негативний контрольний зразок відповідно. У результаті аналізу в жодній з проб ріпаку не було виявлено генетично модифікованих організмів, на відміну від проб сої, в трьох з яких було встановлено присутність ГМО.

Висновки

Підсумовуючи все вищезазначене, можна зробити висновок, що наявні в контролюючих органах України обладнання та методики здатні до виявлення ГМО у сільськогосподарській продукції. Серед досліджених нами зразків сої та ріпаку, що використовуються у нашій країні, ГМО виявлено у зразках сої.

1. Brookes G., Barfoot P. *GM crops: global socio-economic and environmental impacts 1996-2007* / Graham Brookes, Peter Barfoot. – Donkaster: PG Economics Ltd, 2009. – 128 p. 2. Анисимова О.В. *Разработка подходов к организации и проведению гигиенического контроля за оборотом пищевой продукции, полученной из генно-инженерно-модифицированных организмов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук* / О.В. Анисимова. – М., 2009. – 25 с. 3. Куликов А.М. *ГМО и риски их использования* / А.М. Куликов // *ГМО – скрытая угроза России. Материалы к докладу Президенту Российской Федерации «По анализу эффективности государственного контроля за оборотом генетически модифицированных продуктов питания»*. – М.: Центр экологической политики России, 2004. – С. 47–72. 4. Воинский М.С., Курчаков Е.В., Борхсениус С.Н. *Диагностика ГМО – проблемы и решения* / М.С. Воинский, Е.В. Курчаков, С.Н. Борхсениус // *ГМО – скрытая угроза России. Материалы к докладу Президенту Российской Федерации «По анализу эффективности государственного контроля за оборотом генетически модифицированных продуктов питания»*. – М.: Центр экологической политики России, 2004. – С. 73–93. 5. Глик Б., Пастернак Дж. *Молекулярная биология. Принципы и применение* / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 585.