

Л.Е. ИВАЧЕНКО, О.Н. ТАРАСОВА, Н.В. МАРТЫНЕНКО,  
А.А. БЛИНОВА, С.И. ЛАВРЕНТЬЕВА

## Исследование генома сои на наличие генетически модифицированных конструкций методом ПЦР real-time

*Качественный и количественный анализ трансгенной ДНК основывается на идентификации регуляторных последовательностей 35S-промотора, NOS-терминатора и специфических генов, используемых в конструкциях генетически модифицированных растений. Методом ПЦР real-time с использованием наборов реагентов «АмплиСенс ГМ Плант-1-FL» и «Соя/35S + FMV/NOS скрининг» было проверено наличие генетически модифицированных конструкций в геноме 46 сортов сои из коллекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои, которые используются в настоящее время или планируются к внедрению в селекционный процесс. Генетически модифицированная ДНК в исследованных образцах не была обнаружена.*

*Ключевые слова:* соя *Glycine max* (L.) Merr., трансгенные растения, генетически модифицированная соя, полимеразная цепная реакция (ПЦР), 35S-промотор, NOS-терминатор, биологическая безопасность.

**Study of the soy genome for the presence of genetically modified constructions by real-time PCR.**  
L.E. IVACHENKO, O.N. TARASOVA, N.V. MARTYNYENKO, A.A. BLINOVA, S.I. LAVRENT'YEVA (Federal Scientific Center All-Russian Research Institute of Soybeans, Blagoveshchensk).

*Qualitative and quantitative analysis of transgenic DNA is based on identification of regulatory sequences of the 35S promoter, NOS terminator and specific genes used in constructs of genetically modified plants. By PCR real-time using the "AmpliSens GM Plant-1-FL" and "Soya/35S + FMV/NOS screening" reagents, the presence of genetically modified constructs in the genome of 46 soybean varieties from the collection of the FSBSI FRC ARSRIS was checked. Genetically modified DNA was not found in the samples examined.*

*Key words:* Soybean *Glycine max* (L.) Merr., transgene plants, genetically modified soybeans, polymerase chain reaction (PCR), 35S-promoter, NOS-terminator, biosafety.

### Введение

В настоящее время, при быстром росте населения на планете, изменении климата и сокращении площади пахотных земель, для обеспечения мировых продовольственных потребностей необходимы сорта сельскохозяйственных культур с высокой урожайностью, обогащенные питательными веществами и устойчивые к различным экологическим и биотическим стрессам [10]. Классическая селекция растений основана на отборе сортов, получаемых в результате близкородственных или отдаленных скрещиваний, но на сегодняшний день генетика вышла на уровень целенаправленного конструирования организмов с нужными признаками и свойствами. Теперь, чтобы получить новый сорт с

---

\*ИВАЧЕНКО Любовь Егоровна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, ТАРАСОВА Ольга Николаевна – младший научный сотрудник, МАРТЫНЕНКО Наталья Владимировна – младший научный сотрудник, БЛИНОВА Анастасия Андреевна – младший научный сотрудник, ЛАВРЕНТЬЕВА Светлана Игоревна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник (Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский институт сои, Благовещенск). \*E-mail: ivachenko-rog@yandex.ru

интересующими характеристиками, чаще используют генетическую инженерию, которая осуществляет трансформацию растений путем введения в клетку *in vitro* фрагментов чужеродной или измененной ДНК [8]. Для двудольных растений, к которым относится соя, чаще применяются методы бактериальной и вирусной трансформации [2, 5].

Использование перечисленных методов геномной модификации (ГМ) растений привело к тому, что по состоянию на март 2021 г., по данным Международного сервиса по сбору агробиотехнологических приложений (ISAAA), в мире зарегистрировано уже 525 генно-инженерно-модифицированных линий 32 видов растений [6]. С 1996 по 2020 г. мировые площади посевов ГМ культур возросли более чем в 100 раз, достигнув почти 200 млн га, что составляет около 12 % от площади всех возделываемых в мире земель. Одной из основных ГМ культур<sup>1</sup> является соя, посевы которой занимают 91,9 млн га (48,2 % от общей площади посевов ГМ растений). В общей структуре мирового производства ГМО соя, кукуруза, рапс и хлопок составляют примерно 99 % [7, 9]. В России, по данным Роспотребнадзора и Россельхознадзора, зарегистрировано 28 генетически модифицированных линий 5 видов растений, соя представлена 9 ГМ линиями [10].

Появление ГМО усилило проблему продовольственной безопасности, связанную с недостаточной изученностью их воздействия на здоровье человека и окружающую природу, и повысило спрос на точные методы, направленные на идентификацию трансгенной ДНК, в том числе в сельскохозяйственных культурных растениях [8]. Метод ПЦР *real-time* является наиболее специфичным и чувствительным методом, позволяющим обнаруживать генетически модифицированные растения, точно идентифицировать конкретную линию и проводить их количественный анализ относительно общего содержания растительного компонента<sup>2</sup> [9]. Для качественного и количественного обнаружения ГМО методом ПЦР *real-time* подбирают праймеры и зонды, специфичные общим для трансгенных растений фрагментам ДНК-промотора и терминатора, наборы основных мишеней (*35S<sub>CaMV</sub>*, *FMV*, *NOS*) или другие регуляторные последовательности, например ДНК-фрагмент промотора *P-FMV* [1, 12].

В условиях общемировой тенденции увеличения использования ГМО контроль является гарантией обеспечения необходимого уровня безопасности для населения в странах, импортирующих продовольствие. Система контроля за ГМО на продовольственном рынке РФ разработана на основании фундаментальных исследований, проведенных РАН, РАМН, РАСХН, и внедрена в практику Роспотребнадзора, агропромышленного комплекса страны, таможенной службы и других заинтересованных ведомств [3, 11]. В Российской Федерации действует закон<sup>3</sup>, в соответствии с которым запрещены ввоз на территорию страны и использование для посева семян растений, генетическая программа которых изменена с использованием методов геномной инженерии. Закон запрещает также разводить ГМ животных на территории РФ. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках государственного надзора осуществляет контроль над продукцией, полученной с применением ГМО или содержащей такие организмы. В первом полугодии 2019 г. не зарегистрированные в Российской Федерации линии ГМО были выявлены в 22 пробах пищевой продукции. Россельхознадзор регулярно проверяет жалобы о том, что в российском рапсе и соевом масле находят ГМО при входящем контроле экспортной продукции в зарубежных странах. В ноябре 2020 г. службой

<sup>1</sup> <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/executivesummary/default.asp> (дата обращения: 06.08.2021).

<sup>2</sup> Осуществление надзора за производством и оборотом пищевых продуктов, содержащих ГМО: Сб. метод. указаний. М.: Федерал. 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. – <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293808/4293808534.pdf> (дата обращения: 06.08.2021).

<sup>3</sup> Федеральный закон от 03.07.2016 № 358-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в части совершенствования государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности».

Россельхознадзора<sup>4</sup> было обнаружено, что в Волгоградской области выращивали ГМ сою<sup>5</sup>. Также пресечены попытки экспортировать ГМ зерно из Хабаровского края, Ставрополя и Татарстана. Дополнительный мониторинг ГМО необходим в учреждениях, занимающихся непосредственно производством семенного материала. В настоящее время специалистами лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои, созданной по национальному проекту «Наука», проводятся научные исследования по различным направлениям, в том числе выявлению генных модификаций в сое.

Целью исследования было изучение семян 46 сортов сои из коллекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои на наличие генетически модифицированных конструкций методом ПЦР *real-time* с использованием готовых тест-систем.

## Материалы и методы

Материалом для исследований служили 46 сортов сои коллекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои (далее Центра), используемых в настоящее время или планируемых к внедрению в селекционный процесс Центра, из следующих стран:

Россия (Лидия, Китросса, Алена, Веретейка [4]);

США (DakSoy, Jim, McCall, Agassiz, Chico, Barnes, Norpro, Council, Dawson, AD 19 Prosoy, AD20 Sargent, AD21 Kato, AD22 MN1401, AD23 Parker, AD25 Felix, AD26 NE1900, MN0201);

Канада (Максус, Кассиди, Каната, Киото, Кофу, Опус, Саска);

КНР (Хэйхэ 13, Хэйхэ 14, Хэйхэ 18, Хэйхэ 22, Хэйхэ 43, Хэйхэ 44, Хэй 05-1480, Хэй 05-1671, Хэй 11-1161, Хэй 13-3345-2, Хэй 13-3387-1, Хэй 13-3387-5, Хэй 13-3419-1, Хэй 13-3419-4, Хэй 13-3419-6, Хэй нун 53 б.ш., Харбин 09-4896);

Япония (Hidaka).

Выделение ДНК из образцов проводили в соответствии с инструкцией производителей комплекта реагентов «ДНК-сорб-С-М»<sup>6</sup> (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и «Сорб-ГМО-А»<sup>7</sup> (ООО «Синтол», Россия).

Первоначально образцы обрабатывали лизирующим раствором, при этом происходила деструкция клеточных мембран, высвобождение нуклеиновых кислот и клеточных компонентов. Далее нуклеиновые кислоты связывались с частицами сорбента и удалялись из раствора центрифугированием, а затем элюировались из сорбента. Полученные таким образом высокоочищенные препараты нуклеиновых кислот, свободные от ингибиторов реакции амплификации, хранили при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до использования.

ПЦР (полимеразную цепную реакцию) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США), используя наборы готовых реагентов «АмплиСенс ГМ Плант-1-FL»<sup>8</sup> (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и «Соя/35S + *FMV/NOS* скрининг»<sup>9</sup> (ООО «Синтол»),

<sup>4</sup> [https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news\\_details.php?ELEMENT\\_ID=12423](https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=12423) (дата обращения: 06.08.2021).

<sup>5</sup> <https://www.interfax.ru/russia/736742> (дата обращения: 06.08.2021).

<sup>6</sup> Инструкция по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из биологического материала «ДНК-сорб-С-М». – <https://www.amplisens.ru/upload/iblock/f32/DNK-sorb-C-M.pdf> (дата обращения: 22.10.2021).

<sup>7</sup> Инструкция по применению. Набор реагентов для выделения ДНК из растительного материала, продуктов питания, пищевого сырья растительного и животного происхождения, кормов для животных и семян «Сорб-ГМО-А». – <https://www.syntol.ru/bitrix/docs/GM-502%20SORB-GMO-A%20instrukciya.pdf> (дата обращения: 22.10.2021).

<sup>8</sup> Инструкция по применению набора реагентов АмплиСенс® ГМ Плант-1-FL. – <https://www.amplisens.ru/upload/iblock/b15/GM%20Plant-1-FL.pdf> (дата обращения: 22.10.2021).

<sup>9</sup> Инструкция по применению. Набор реагентов для обнаружения ДНК сои и регуляторных последовательностей 35S, *FMV*, *NOS* в геноме ГМО растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «Соя/35S + *FMV/NOS* скрининг». – <https://www.syntol.ru/bitrix/docs/GM-416-instrukciya.pdf> (дата обращения: 22.10.2021).

Россия), предназначенные для выявления фрагментов ДНК промотора (*P-35S*) последовательности *35S* вируса мозаики цветной капусты, терминатора гена нопалин-синтетазы из *Agrobacterium tumefaciens* (*T-NOS*), промотора (*P-FMV*) *35S* вируса мозаики норичника. Кроме того, определяли с помощью «АмплиСенс ГМ Плант-1-FL» эндогенный контроль растений, то есть ген, специфичный для растительного генома (трансгенного и нетрансгенного), как свидетельство присутствия ДНК растительного происхождения в исследуемом образце, а с помощью «Соя/*35S* + *FMV/NOS* скрининг» – ген *AAT1*, кодирующий аспаратаминотрансферазу сои.

В отдельных пробирках для амплификации готовили реакционную смесь объемом 25 мкл: 15–20 мкл смеси для проведения ПЦР *real-time*, по 5–10 мкл образца выделенной ДНК (для отрицательного и положительного контроля). Амплификацию проводили по программе с установкой шагов: 94–95 °С – 3–15 мин, 1 цикл; 94–95 °С – 10–15 с, 42–45 циклов; 59 °С – 50–60 с, 42–45 циклов [6, 8].

В качестве флуоресцирующих соединений, применяемых для определения специфических последовательностей, использовали флуорофоры FAM, HEX, JOE, ROX и Cy5. Для набора реагентов «АмплиСенс ГМ Плант-1-FL» канал флуорофора FAM соответствовал регистрации сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации ДНК *P-35S*, JOE – ДНК растений, ROX – ДНК *T-NOS*, Cy5 – ДНК *P-FMV*. Набор реагентов «Соя/*35S* + *FMV/NOS* скрининг» позволял одновременно выявлять в одной реакционной смеси специфичные фрагменты ДНК регуляторных последовательностей: по каналу флуоресценции FAM – терминатора *NOS*, ROX – промоторов *35S CaMV* и *35S FMV*; HEX – специфичный фрагмент ДНК сои, Cy5 – внутренний положительный контроль. Анализ кривых накопления флуоресцентного сигнала по каждому каналу детекции проводили при помощи программного обеспечения прибора на основе гибридно-флуоресцентной детекции в программе Bio-Rad CFX Manager. Результаты интерпретировали на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции на соответствующем канале с пороговой линией, что определяло наличие или отсутствие для данной пробы значения порогового цикла *Сt*. Исследование считали достоверным, если были получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК. Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel 2010.

## Результаты и обсуждение

Количественный анализ ГМ ДНК в растительном материале представлял собой расчет отношения ее количества к общему количеству ДНК исследуемого сорта, качественный анализ отображал наличие или отсутствие трансгенов. Используемые готовые тест-системы позволяли проводить две независимые реакции в одной пробирке, которые фиксировали с помощью специфических зондов (флуорофоров) ДНК исследуемого растения и генно-модифицированные последовательности.

На рис. 1 и 2 представлены графики кривых плавления относительно выбранного флуорофора, полученные в ходе амплификации заданных фрагментов: *35S*-промотора и *NOS*-терминатора, а также выделенных фрагментов ДНК. Кривые положительного контроля устремлены вверх относительно выбранного флуорофора для каждого набора («Соя/*35S* + *FMV/NOS* скрининг» – FAM (*NOS*) и ROX (*35S*, *FMV*), «АмплиСенс ГМ Плант-1-FL» – ROX (*NOS*) и FAM (*35S*)). Анализ выделенных ДНК показал, что широко встречающиеся у ГМ растений фрагменты энхансера (*E-35S*) и промотора (*P-35S*) последовательности *35S* вируса мозаики цветной капусты, терминатора гена нопалин-синтетазы из *Agrobacterium tumefaciens* (*T-NOS*), а также энхансера (*E-FMV*) и промотора (*P-FMV*) *35S* вируса мозаики норичника отсутствуют во всех образцах. Значения порогового цикла не определялись по трем каналам (Cy5, FAM и ROX). Выделенные фрагменты ДНК не превышали пороговых

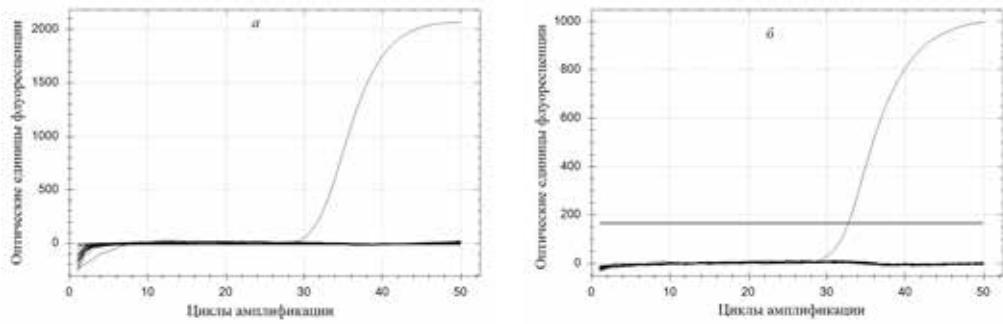


Рис. 1. Результаты амплификации выделенных фрагментов ДНК сортов сои с использованием набора реагентов «Соя/35S + FMV/NOS скрининг»: а – флуорофор ROX (35S, FMV), б – FAM (NOS)

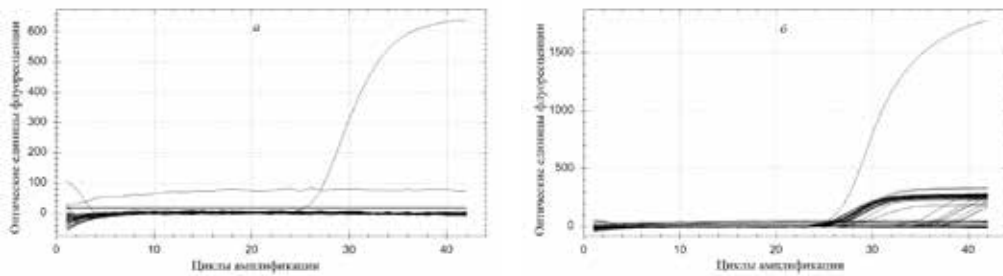


Рис. 2. Результаты амплификации выделенных фрагментов ДНК сортов сои использованием набора реагентов «АмплиСенс® ГМ Плант-1-FL»: а – флуорофор FAM (35S), б – ROX (NOS)

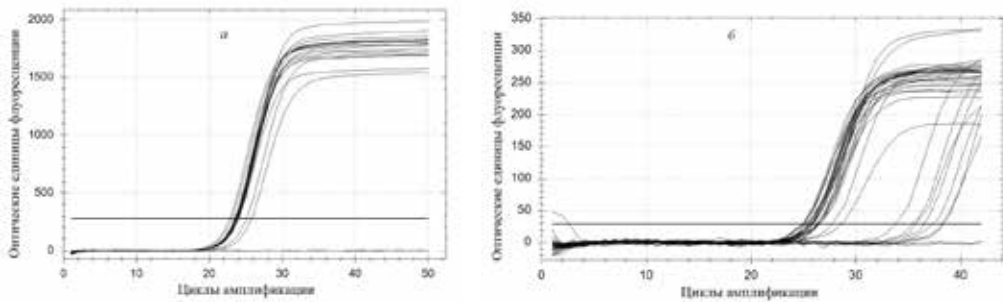


Рис. 3. Результаты амплификации выделенных фрагментов ДНК сортов сои с использованием наборов реагентов: а – «Соя/35S + FMV/NOS скрининг», флуорофор HEX (соя), б – «АмплиСенс® ГМ Плант-1-FL», флуорофор JOE (ДНК растений)

значений (0,1 % от общего количества ДНК) и представлены на графике в виде горизонтальных линий.

На рис. 3 показаны кривые накопления флуоресцентного сигнала для анализируемых образцов сои. При амплификации с применением тест-систем «Соя/35S + FMV/NOS скрининг» по каналу HEX (соя) и «АмплиСенс® ГМ Плант-1-FL» по каналу JOE (растения) определена положительная динамика, что свидетельствует о наличии ДНК сои во всех исследуемых образцах.

Наборы тест-систем «АмплиСенс® ГМ Плант-1-FL» и «Соя/35S + FMV/NOS скрининг» позволили получить качественную оценку анализируемых образцов сортов сои

зарубежной и российской селекций. Установлено, что в реакционной смеси во всех случаях:

1) гены сои или других растений содержались в количестве, достаточном для подтверждения наличия растительных компонентов в образце и пригодности ДНК для ПЦР-анализа;

2) обнаружены растительные гены;

3) не обнаружены специфичные для ГМО регуляторные последовательности (промоторы *CaMV 35S*, *FMV 35S* и терминатор *NOS*), т.е. ни один из испытуемых образцов 46 сортов сои не является генно-модифицированным.

## Заключение

Современные тенденции развития рынка ГМ культур требуют значительного расширения числа испытательных лабораторий по определению ГМО и внедрения в рутинную практику отработанных методик идентификации ГМ-линий. Лабораторией биотехнологии при определении ГМ в ДНК семенного материала коллекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои использовался системный подход, при отборе материала для мониторинга принимались во внимание: страна происхождения продукции, зарегистрированные в указанных странах ГМ линии, сведения из официальных баз данных. При идентификации ГМ линий использовали метод ПЦР в режиме реального времени не только в связи с его высокой достоверностью, минимальным риском получения ошибочного результата при исследовании, быстротой ПЦР-анализа, а также учитывая факт, что данный метод является арбитражным во всем мире. Впервые в условиях ПЦР-лаборатории Центра был проведен скрининг коллекции семян сои ФГБНУ ФНЦ ВНИИ сои на наличие генетически модифицированных конструкций методом ПЦР *real-time* с использованием готовых тест-систем.

В результате анализа на наличие генетически модифицированных конструкций методом ПЦР *real-time* 46 российских и зарубежных сортов сои, имеющихся в коллекции ФНЦ ВНИИ сои, ГМ последовательности в исследуемых образцах не были выявлены. Подтверждена возможность беспрепятственного использования исследуемого генетического материала в селекционной работе Центра.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Я.И., Хотяинцева Т.В., Боровская С.В., Колобова О.С., Варламов Д.А., Харченко П.Н. 35S Промотор вируса мозаики норичника (*P-FMV*) – новая мишень для анализа на содержание генетически модифицированных организмов // Изв. ТСХА. 2011. Вып. 6. С. 156–161.
2. Аляпкина Ю.С., Моисеева М.В., Ксенофонтова О.В., Алексеев Я.И. 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 // Изв. ТСХА. 2018. Вып. 3. С. 5–16.
3. Генетически модифицированные источники пищи: оценка безопасности и контроль / И.Н. Аксюк и др.; под ред. В.А. Тутельяна. М.: Изд-во РАМН, 2007. 442 с.
4. Каталог сортов сои / Е.М. Фокина, Г.Н. Беляева, М.О. Синеговский и др. Благовещенск: ОДЕОН, 2021. 69 с.
5. Лобов В.П., Томилин М.В., Веселов А.П. Генетически модифицированные растения: достижения, перспективы и ограничения // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. 2010 № 2-2. С. 423–429.
6. Малак Алкубеси, Акинина Т.Н., Прасолова О.В. Разработка методики идентификации ГМ линии сои 87751 на основе полимеразно-цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» // Актуальные вопросы ветеринарии, зоотехнии, биотехнологии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения: материалы Нац. науч.-практ. конф. М., 2021. С. 3–5.
7. Мухаммадиева Г.Ф., Бакиров А.Б., Каримов Д.О., Кудояров Э.Р., Назарова Л.Ш., Валова Я.В., Зиятдинова М.М. Анализ содержания компонентов генетически модифицированных организмов как элемент риск-ориентированного надзора за безопасностью пищевых продуктов // Анализ риска здоровью. 2020. № 4. С. 92–97.

8. ПЦР в реальном времени. 6-е изд. / под ред. Д.В. Ребрикова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. 223 с.
9. Тышко Н.В. Контроль за генно-инженерно-модифицированными организмами растительного происхождения в пищевой продукции: научное обоснование и методическое обеспечение // *Вопр. питания*. 2017. Т. 86, № 5. С. 29–33.
10. Kumar K., Gambhir G., Dass A., Tripathi A.K., Singh A., Jha A.K., Yadava P., Choudhary M., Rakshit S. Genetically modified crops: current status and future prospects // *Planta*. 2020. Vol. 251, iss. 4. Art. 91.
11. Tutelyan V.A. (ed.). *Genetically Modified Food Sources. Safety Assessment and Control*. San Diego: Elsevier; Academic Press, 2013. 338 p.
12. Windels P., Taverniers I., Depicker A., Van Bockstaele E., De Loose M. Characterisation of the Roundup Ready soybean insert // *Eur. Food Res. Technol.* 2001. Vol. 213, iss. 2. P. 107–112.