

УДК: 577.216:577.218



<https://dx.doi.org/10.36522/2181-9637-2019-6-5>

ГЕНЕТИК МОДИФИКАЦИЯЛАНГАН ДНКНИ ЎЗБЕКИСТОНДАГИ ОЗИҚ-ОВҚАТЛАРДА АНИҚЛАШ

Абдираимова Хумора Мардойевна

стажер-тадқиқотчи

Шерматов Шухрат Эрматович

биология фанлари номзоди, катта илмий ходим

Ўзбекистон Республикаси Фанлар академияси

Геномика ва биоинформатика маркази

Аннотация. Мақола Ўзбекистон бозорларида генетик ўзгартирилган озиқ-овқатларни аниқлашга бағишланган. Озиқ-овқатларда генетик ўзгартирилган организмлар (ГЎО)нинг мавжудлиги полимераза занжир реакцияси услуби ёрдамида рангли карам мозаик вирусининг 35S промотори ва *Agrobacterium tumefaciens* тупроқ бактерияси Ti плазмидасининг NOS терминаторини (T-NOS) нуклеотид кетма-кетликларини қидириш орқали тадқиқ қилинди. Олиб борилган тадқиқот ўрганилган ДНК намуналарида ген-инженерияси ёрдамида киритилган ўзгаришларни аниқламади. Ушбу илмий ишда ишлатилган услублар ва олинган натижалар генетик ўзгартирилган организмларни аниқлаш бўйича хизматни ташкил этиши учун асос бўлади.

Таянч тушунчалар: генетик ўзгартирилган организмлар, 35S промотор, NOS терминатор, скрининг, полимераза занжир реакцияси.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО ДНК В ПРОДОВОЛЬСТВИИ, РЕАЛИЗУЕМОМ В УЗБЕКИСТАНЕ

Абдираимова Хумора Мардойевна

стажер-исследователь

Шерматов Шухрат Эрматович

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Центр геномики и биоинформатики

Академии наук Республики Узбекистан

Аннотация. Статья посвящена выявлению генетически модифицированного продовольствия на рынках Узбекистана. Исследование продуктов на наличие генетически модифицированных организмов (ГМО) проводили методом полимеразной цепной реакции, путем поиска нуклеотидных последовательностей 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и терминатора NOS (T-NOS) Ti плазмиды почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Анализ не выявил ни у одного из исследованных образцов ДНК изменения, введенные с помощью генной инженерии. Применяемые в данной работе методы и полученные результаты будут использованы для организации сервиса по идентификации генетически модифицированных организмов.

Ключевые слова: генетически модифицированные организмы, 35S промотор, терминатор NOS, скрининг, полимеразная цепная реакция.

IDENTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED
DNA IN FOOD PRODUCED IN UZBEKISTAN**Adbiraimova Humora Mardoevna**

Junior Researcher

Shermatov Shukhrat Ermatovich

PhD in Biological Sciences, Senior Researcher

Center for Genomics and Bioinformatics,
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

Abstract. *The article is devoted to the identification of genetically modified food in the markets of Uzbekistan. The study of food products for the presence of genetically modified organisms (GMOs) was carried out on the basis of the polymerase chain reaction method by searching for the nucleotide sequences of the 35S promoter of the cauliflower mosaic viruses (CaMV) and the NOS terminator (T-NOS) Ti plasmid of the soil bacteria Agrobacterium tumefaciens. The analysis did not reveal any changes in the DNA samples introduced by genetic engineering. The methods used in this study and the results obtained will serve for identification the genetically modified organisms.*

Keywords: *genetic modified organisms, 35S promoter, NOS-terminator, screening, polymerase chain reaction.*

Введение

Создание новых сортов сельхозкультур с улучшенными агрономическими признаками, такими как высокая урожайность, скороспелость, устойчивость к различным биотическим и абиотическим стрессам, с помощью методов традиционной селекции является длительным процессом, и для этого может потребоваться 15–20 лет. Развитие генной инженерии позволило вносить искусственные изменения в геном организмов путем введения генетических векторов, содержащих нуклеотидные последовательности интересующего гена, и за короткие сроки получать новые сорта сельхозкультур с улучшенными признаками, которые стали широко известны как генетически модифицированные организмы (ГМО). Так, генно-инженерные технологии позволили ученым перенести в сельхозкультуры из других организмов гены, вызывающие устойчивость к гербицидам и насекомым [1, 2].

С момента коммерциализации первой генетически модифицированной культуры (ГМК) площади их посевов увеличились многократно и достигли в 2017 году 189,8 млн гектаров по всему миру. В настоящее время генетически модифицированные сель-

хозкультуры выращиваются в более чем 20 странах мира, показывая рост расширения площадей в 2017 году на 4,7 млн гектаров (3%) по сравнению с 2016 годом [3]. В международных электронных базах данных зарегистрированы десятки сортов более 30 видов культур. Самыми широко высеваемыми ГМК являются: соя – 94,1 млн га, кукуруза – 59,7 млн га, хлопчатник – 24,1 млн га, канولا – 10,2 млн га. Основным признаком, введенным в ГМК, является устойчивость к гербицидам и насекомым.

Однако в связи с тем, что реализуемые в настоящее время на рынках генетически модифицированные сельхозкультуры созданы путем внедрения в их геном генов чужеродных организмов, среди потребителей возникает беспокойство относительно их безопасности. Поэтому идентификация генетически модифицированных организмов в пищевых продуктах стала важным аспектом в контроле пищевых продуктов [4–8]. Узбекистан является частью глобальной экономики, и ежегодно в республику импортируется множество продовольственных товаров и семян сельхозкультур, что допускает распространение ГМО на рынках Узбекис-

Таблица 1

Отобранный материал

Название продукта	Количество отобранных образцов	Место отбора
Огурец посевной	6	Рынок Куйлюк
Томат	7	Рынок Куйлюк
Болгарский перец	5	Рынок Куйлюк
Морковь	4	Рынок ТТЗ
Картофель	4	Рынок ТТЗ
Баклажан	2	Рынок ТТЗ
Рис	4	Экобазар
Мука	5	Экобазар
Сухое молоко	2	Экобазар

тана. Ранее исследование колбасных изделий, продаваемых в Узбекистане, показало присутствие в них генетически модифицированной сои [9].

Целью данного исследования было проведение молекулярного скрининга сельхозпродукции и продовольствия, реализуемых на рынках Узбекистана, для мониторингирования ГМО.

Материалы и методы

Для исследования на рынках Ташкента были отобраны различные продукты: 6 сортов и гибридов огурца посевного, 7 – томатов, 5 – болгарского перца, 3 – красной моркови, 1 – желтой моркови, 4 – картофеля, 2 – баклажана, а также: 4 вида риса, 5 – муки и 2 – сухого молока (табл. 1).

Выделение ДНК и определение концентрации

Геномную ДНК выделяли из отобранных продуктов с помощью СТАВ-метода [10]. Выделенная ДНК была растворена в 100 мкл ТЕ-буфера. Концентрация ДНК была определена с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000, доведена до 10 нг/мкл и хранилась при температуре – 20 °С до использования в ПЦР-анализе.

Амплификация ДНК

Реакционную смесь для ПЦР в объеме 10 мкл готовили по схеме: 15 нг геномной ДНК, 1 мкл 10 x Taq буфера, 0,2 мкл dNTP (10 mM каждый), 5 pM/мкл праймер, 0,07 мкл Taq полимеразы (5 ед./мкл AmpliTaq Gold, Applied Biosystems), вода до 10 мкл. ПЦР проводили в следующих условиях: 1 цикл – 94 °С, 3 мин.; 35 циклов – 94 °С, 1 мин.; 55 °С, 1 мин.; 72 °С, 2 мин.; 1 цикл – 72 °С, 7 мин.

Для анализа в качестве положительного контроля была использована геномная ДНК трансгенной сои. Для проведения скрининга с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) были отобраны праймеры, созданные для идентификации 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (p35S-cf3/p35S-cr4) и терминатора NOS Agrobacterium tumefaciens (HA-nos 118-f/ HA-nos 118-r) (табл. 2).

Гель-электрофорез

Амплифицированную ДНК анализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ом агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Оценку результатов ПЦР проводили по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических фрагментов 35S промотора (123 п.о.) и терминатора NOS (118 п.о.) путем сравнения с фрагментами ДНК-маркера Gene Ruler 50 bp (Thermo Fisher Scientific).

Таблица 2

Информация о праймерах

Название маркера	Нуклеотидная последовательность	Длина	Размер фрагмента (п.о.)
p35S-cf3	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG	21	123
p35S-cr4	TCCTCTCCAAATGAAATGAACITCC	25	
HA-nos 118-f	GCAATGACGTTATTTATGAGATGGG	24	118
HA-nos 118-r	GACACCGCGCGCGATAATTATCC	24	

Результаты и обсуждение

Для детекции ГМО разработаны различные методы, основанные на обнаружении ДНК или белка. Тем не менее ПЦР стал главным инструментом в идентификации генетически модифицированной ДНК. Он показал хорошие результаты при использовании специфических праймеров для выявления регуляторных последовательностей или фрагментов структурных генов. К настоящему моменту коммерциализированы десятки сортов ГМК по всему миру, и в большинство из них трансформированы 35S промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и терминатор NOS *Agrobacterium tumefaciens*, которые необходимы для правильного функционирования интересующего гена. Поэтому первичный скрининг ГМК основан на идентификации промотора 35S и терминатора NOS с помощью обычного или количественного ПЦР [11, 12].

Мы отобрали на рынках Ташкента семена и продукты различных сельхозкультур, в том числе и образцы сухого молока, всего 39 проб (рис. 1). За исключением сухого молока, из всех образцовых проб с помощью метода СТАВ успешно выделена геномная ДНК. Отсутствие ДНК в пробах 38 и 39 указывало на то, что, возможно, образцы сухого молока и не животного, и не растительного происхождения. Несмотря на отсутствие видимых следов геномной ДНК образцы 38 и 39 также были

использованы в исследовании, так как ПЦР является очень чувствительной технологией, и она может обнаружить даже небольшое количество молекул ДНК. Все образцы были скринированы с помощью праймеров, разработанных для детекции 35S CaMV и терминатора NOS *Agrobacterium tumefaciens*. В качестве позитивного контроля была использована геномная ДНК трансгенной сои. Для проверки реакций на контаминацию был использован отрицательный контроль – стерильная дистиллированная вода. Исследование показало отсутствие в отобранных пробах позитивной реакции по обоим праймерам, т.е. геномная ДНК образцов не содержала фрагментов промотора 35S CaMV и терминатора NOS (табл. 3). В то же время геномная ДНК трансгенной сои показала позитивную реакцию в обоих случаях, т.е. были амплифицированы фрагменты 35S и терминатора NOS, 123 и 118 пар оснований (п.о.) соответственно.

В связи с расширением площадей посевов ГМК в мире на рынках появляются все больше пищевых продуктов, содержащих ГМ-ингредиенты. Для защиты права потребителя на выбор товара многие страны ввели законы, регулирующие маркировку этих продуктов [13]. В базе данных Международной службы оценки применения агробиотехнологий (ISAAA) ежегодно регистрируются новые биотехнологические сорта сельхозкультур и предо-



Рис. 1. Образцы продуктов, отобранные для исследования

Таблица 3
Результаты ПЦР-анализа

Вид	№ пробы	ДНК	ДНК-маркеры	
			CaMV 35S	NOS-t
Огурец посевной	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
	4	+	-	-
	5	+	-	-
	6	+	-	-
Томат	7	+	-	-
	8	+	-	-
	9	+	-	-
	10	+	-	-
	11	+	-	-
	12	+	-	-
	13	+	-	-
Болгарский перец	14	+	-	-
	15	+	-	-
	16	+	-	-
	17	+	-	-
	18	+	-	-
Морковь	19	+	-	-
	20	+	-	-
	21	+	-	-
	22	+	-	-
Картофель	23	+	-	-
	24	+	-	-
	25	+	-	-
	26	+	-	-
Баклажан	27	+	-	-
	28	+	-	-
Рис	29	+	-	-
	30	+	-	-
	31	+	-	-
	32	+	-	-
Мука	33	+	-	-
	34	+	-	-
	35	+	-	-
	36	+	-	-
Сухое молоко	37	+	-	-
	38	-	-	-
	39	-	-	-
Контроль	К+	+	+	+
	К-	-	-	-

ставляется информация об их использовании в качестве корма и продовольствия. Например, данной службой зарегистрированы 49 биотехнологических сортов картофеля, 237 сортов кукурузы, 41 сорт сои, 11 сортов томата и т.д. Однако не все эти сорта еще разрешены для выращивания и использования в качестве продовольствия. Также необходимо отметить, что при создании новых сортов используются новые регуляторные элементы генома. Более того, на рынках появляются нигде не зарегистрированные ГМК, которые выявляются во время проведения мониторинга. Таким образом, развитие генной инженерии, а также необходимость обеспечения стабильного сельскохозяйственного производства ведет к разработке новых генно-инженерных сортов сельскохозяйственных культур, которые все шире используются в производстве продовольствия, и это является неизбежным процессом. Поэтому для обеспечения мониторинга рынка на присутствие ГМО необходимо развивать технологии идентификации ГМО.

Выводы

Хотя генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры приносят значительные экономические выгоды, в обществе имеется беспокойство относительно их безопасности. Поэтому во многих странах приняты законы по маркировке продуктов, содержащих ГМО, которые требуют разработки и оптимизации методик по их идентификации. В данной работе были успешно использованы методы выделения ДНК и проведение ПЦР, которые применяются для исследования генома хлопчатника. Наша работа по идентификации ГМО не выявила в ДНК исследованных образцов овощей, риса, муки и сухого молока следов генно-инженерных манипуляций.

Узбекистан с каждым годом все глубже интегрируется в мировую экономику, и в дальнейшем это неизбежно приведет к принятию Закона о ГМО, который будет регулировать обязательное тестирование продуктов питания на содержание ГМ-ингредиентов. Используемые в данной работе методы и полученные результаты будут служить основой для организации сервиса по идентификации в продуктах питания генетически модифицированных источников.

Источники и литература

1. Block M.D., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gosselé V., Movva N.R., Thompson C., Montagu M.V. & Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme // *The EMBO Journal*. – 1987. – No 6(9). – 25132518.
2. Moellenbeck D.J., Peters M.L., Bing J.W., Rouse J.R., Higgins L.S., Sims L., Nevshemal T., Marshall L., Ellis R.T., Bystrak P.G., Lang B.A., Stewart J.L., Kouba K., Sondag V., Gustafson V., Nour K., Xu D., Swenson J., Zhang J., Czapla T., Schwab G., Jayne S., Stockhoff B.A., Narva K., Schnepf H.E., Stelman S.J., Poutre C., Koziel M. & Duck N. Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms // *Nature Biotechnology*. – 2001. – No 19(7). – P. 668-672.
3. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), URL. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/53/>.
4. Kim J.H., Kim S.Y., Lee H., Kim Y.R., Kim H.Y. An event-specific DNA microarray to identify genetically modified organisms in processed foods // *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. – 2010. – No 58. – P. 6018-6026.
5. Vijayakumar K.R., Martin A., Gowda L.R., Prakash V. Detection of genetically modified soya and maize: Impact of heat processing // *Food Chemistry*. – 2009. – No 117. – P. 514-521.
6. Chaouachi M., Zellama M.S., Nabi N., Hafsa A.B. Saïd K. Molecular identification of four genetically modified maize (Bt11, Bt176, Mon810 and T25) by duplex quantitative real-time PCR // *Food Analytical Methods*. – 2014. – vol. 7. – No 1. – P. 224-233.
7. Xu W., Yuan Y., Luo Y., Bai W., Zhang C. and Huang K., Event-specific detection of stacked genetically modified maize Bt11 x GA21 by UP-M-PCR and real-time PCR, *J. Agric //Food Chem.* – 2009. – No 57. – P. 395-402.
8. Côté M.-J., Meldrum A.J., Raymond P. and Dollard C. Identification of genetically modified potato (*Solanum tuberosum*) cultivars using event specific polymerase chain reaction // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – vol. 53. – No. 17. – P. 6691-6696.
9. Абдираимова Х.М., Шерматов Ш.Э., Имамжоджаева А.С. Исследование колбасных продуктов на содержание ГМО // Сборник тезисов Республиканской научной конференции «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии» 18 мая 2018.г. – С. 23-24.
10. Querci M., Jermini M. and den Eede G.V. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. European Commission / Joint Research Centre, Germany, ISBN: 92-79-02242-3, 2006.
11. Barbau-Piednoir E., Stragier P., Roosens N., Mazzara M., Savini C., Van den Eede G. Inter-laboratory testing of GMO detection by combinatory SYBR® Green PCR screening (CoSYPS) // *Food Anal. Methods*. – 2014. – No 7. – P. 1719-1728.
12. Park S.B., Kim H.Y. and Kim J.H. Multiplex PCR System to Track Authorized and Unauthorized Genetically Modified Soybean Events in Food and Feed // *Food Control*. – 2015. – No 54. – P. 47-52.
13. Dong W., Yang L., Shen K., Kim B., Kleter G.A., Marvin H.J. et al. GMDD: a database of GMO detection methods // *BMC Bioinformatics*. – 2008. – No 9:260.

Рецензент:

Ризаева С.М., доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Института генетики и экспериментальной биологии АН РУз.