

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.2.08, 57.088.1, 58.088

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ
РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ
И СЫРЬЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИДРОГЕЛЕВОГО
ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО МИКРОЧИПА**

© 2011 г. Д. А. Грядунов^{1*}, И. А. Гетман², С. И. Чижова², В. М. Михайлович¹,
А. С. Заседателей¹, Г. А. Романов²

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, 127276

Поступила в редакцию 15.03.2011 г.

Принята к печати 11.04.2011 г.

Предложен метод мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на гидрогелевом олигонуклеотидном биочипе для идентификации десяти различных трансгенных элементов растительной ДНК в пищевых продуктах и сырье. Биочип содержит 22 иммобилизованных олигонуклеотидных зонда, предназначенных для: 1) выявления ДНК растительного происхождения; 2) установления принадлежности ДНК к одной из культур (соя, кукуруза, картофель, рис); 3) идентификации генетических детерминант трансгенности, включая последовательности промоторов 35S CaMV, 35S FMV, гена актина риса, терминаторов nos, 35S CaMV, ocs, гена *rbcS1* гороха, маркерных генов *bar*, *gus*, *nptII*. Метод позволяет выявлять не менее 0.5% генетически модифицированной ДНК сои и кукурузы в исследуемых образцах. При идентификации трансгенной ДНК в образцах пищевых продуктов и кормов результаты анализа, проведенного с использованием разработанного подхода, полностью совпали с полученными методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Предлагаемый метод может быть использован для обнаружения трансгенных образцов при массовом скрининге пищевых продуктов и сырья с целью последующего количественного определения в них генетически модифицированного источника по идентифицированному маркеру трансгенности.

Ключевые слова: генетически модифицированные источники, трансгенные элементы, мультиплексная ПЦР, биочип, гибридизация.

IDENTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED VEGETABLE SOURCES IN FOOD AND FEED USING HYDROGEL OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIP, by D. A. Gryadunov^{1*}, I. A. Getman², S. N. Chizhova², V. M. Mikhailovich¹, A. S. Zasedatelev¹, G. A. Romanov² (¹Engelhard Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, *e-mail: grad@biochip.ru; ²Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia). A method of multiplex polymerase chain reaction (PCR) followed by the hybridization on a hydrogel oligonucleotide biochip was developed for simultaneous identification of ten different transgenic elements of plant DNA in feed and food products. The biochip contained 22 immobilized probes intended for (i) detection of plant DNA; (ii) plant species determination (soybean, maize, potato, rice); (iii) identification of transgenic elements, including 35S CaMV, 35S FMV, rice actine gene promoters, nos, 35S CaMV, ocs, pea *rbcS1* gene terminators, and *bar*, *gus*, *nptII* marker genes. The limit of detection was 0.5% of genetically modified (GM) soybean and maize in analyzed samples. Identification of transgenic DNA in food and feed products using either the developed approach or real-time PCR led to virtually identical results. The assay can be used for selection of GM samples by screening food and feed products for subsequent quantitative determination of the GM component based on the identified transgene.

Keywords: genetically modified sources, transgenic DNA elements, multiplex PCR, biochips, hybridization.

Всего через десятилетие после первой удачной апробации способ введения чужеродных генов в генном растения [1] был реализован в практическом

растениеводстве. Уже в 1994 году в США было получено разрешение на выращивание на сельскохозяйственных угодьях первых трансгенных культур (то-

Принятые сокращения: ГМ – генетически модифицированный(е); ГМИ – генетически модифицированный(е) источник(и).
* Эл. почта: grad@biochip.ru

матов и сои) [2]. С этого времени наблюдается неуклонный рост как спектра разрешенных к использованию трансформированных культур, так и масштабов их выращивания. В настоящее время во всем мире к сельскохозяйственному производству допущено уже более 100 линий генетически модифицированных (ГМ) растений. По данным Международной службы мониторинга использования сельскохозяйственных биотехнологий (ISAAA), площади, занятые под ГМ-культуры, составили в 2010 году примерно 148 млн. га. Главные производители ГМ-культур — США (66.8 млн. га), Бразилия (25.4 млн. га), Аргентина (22.9 млн. га), Индия (9.4 млн. га) и Канада (8.8 млн. га). Индия, впрочем, пока выращивает только непившевую ГМ-культуру — хлопок. В качестве продовольственного сырья доминируют соя, кукуруза и рапс. Так, в 2010 году в мировом производстве сои и кукурузы на трансгенные сорта приходилось соответственно 50 и 31% [3].

Трансгенные культуры позволяют увеличить объемы производимой сельскохозяйственной продукции и/или снизить ее себестоимость и тем самым приносят в нашу цивилизацию очевидную пользу. Однако, будучи качественно новым достижением современных биотехнологий, они вызывают и определенные опасения с точки зрения возможных негативных последствий как у сторонников традиционного земледелия, так и у ученых [4].

Неоходимость оценки возможных биологических и экологических рисков при быстром распространении генно-модифицированных источников (ГМИ) и полученных на их основе продуктов питания ставит неотложный вопрос о контроле за потоками ГМИ [5]. В странах Европейского союза (ЕС) законодательно введены строгие ограничения по выращиванию трансгенных культур и обязательная маркировка продуктов питания на присутствие трансгенных добавок, если их доля в составе продукта превышает 0.9% [6]. В большинстве других развитых стран также введены требования маркировки продуктов питания при превышении порогового содержания ГМИ [7]. Аналогичная нормативная база, необходимая для организации и проведения эффективного надзора за пищевыми продуктами, содержащими компоненты, полученные с применением ГМИ, выработана и в России. За последние годы на территории РФ официально были разрешены к использованию в качестве пищевых ингредиентов 18 сортов трансгенных культур, среди них восемь линий кукурузы, три линии сои, две линии свеклы, одна линия риса и четыре линии картофеля.

С 12.12.2007 в РФ, в соответствии с поправками в Федеральный Закон от 7.02.1992 № 2300-1 “О защите прав потребителей”, предельное, не требующее маркировки, содержание ГМИ в продуктах питания составляет, как и в странах ЕС, 0.9%. Продукты, в которых содержание ГМИ больше этого

значения, должны быть обязательно промаркированы [8]. Вышеуказанная норма введена как для защиты прав потребителей на предмет их информирования о технологии производства пищевых продуктов, так и для соответствия требованиям ЕС по этикетированию ГМ-содержащих пищевых продуктов.

Из вышеизложенного ясно, насколько важна и актуальна разработка адекватных методов идентификации генетических детерминант трансгенности в растениях, сырье и продуктах питания. Традиционные методы выявления ГМИ основаны на ПЦР, где в качестве мишеней используют, как правило, два фрагмента ДНК: 35S промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и NOS-терминатор *Agrobacterium tumefaciens* [9–11]. Однако при постоянном пополнении трансгенного растительного материала новыми генетическими конструкциями и векторами настоятельно требуется разработка альтернативных молекулярных методов, позволяющих в одном эксперименте идентифицировать широкий спектр трансгенных мишеней [12]. Этому критерию удовлетворяет, в первую очередь, технология биологических микрочипов. В последние годы предложено несколько методик выявления трансгенных последовательностей с использованием ДНК-микрочипов [13–16], в том числе и в коммерческих целях [17]. В Российской Федерации метод определения трансгенных последовательностей ДНК на основе гидрогелевых биологических микрочипов (биочипов) [18], разработанный совместно ИФР РАН и ИМБ РАН [19], утвержден в качестве национального стандарта РФ (ГОСТ Р 52174-2003) для идентификации ГМИ еще в 2003 году. Процедура анализа включала мультиплексную амплификацию пяти фрагментов векторных конструкций и маркерных генов, использованных в качестве трансгенных мишеней, с последующей гибридизацией полученных фрагментов на олигонуклеотидном микрочипе.

В работе описана усовершенствованная методика выявления ГМИ на основе специализированного гидрогелевого биочипа, позволяющая выявлять трансгенную ДНК с высокой чувствительностью (менее 1%) и идентифицировать сразу 10 последовательностей фрагментов трансгенных элементов (промоторов и терминаторов) и маркерных генов в геномах сои, кукурузы, картофеля и риса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и ферменты. В работе использованы наборы для выделения ДНК из продуктов питания или растительного сырья (ЗАО “Синтол”, ООО “НПО ДНК-технология”, Россия); реактивы гуанидинтиоцианат; ЭДТА; буферы Трис-EDTA и NEPER; вода, не содержащая нуклеаз (“Sigma”, США); раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов

Таблица 1. Обозначение и назначение олигонуклеотидов, иммобилизованных на биочипе

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Назначение олигонуклеотида
pIDNA	Ген <i>rbcL</i>	Зонд для идентификации ДНК растительного происхождения
Gm/St ₁	Ген <i>rbcL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК сои и/или картофеля
Zm ₁	Ген <i>rbcL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК кукурузы
Os ₁	Ген <i>rbcL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК риса
Gm ₂	Ген <i>rbcL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК сои
Zm/Os ₂	Ген <i>rbcL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК кукурузы и/или риса
St ₂	Ген <i>rbcL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК картофеля
Le1 (Gm)	Ген лектина <i>LE1</i>	Специфичный зонд для идентификации ДНК сои
Zein (Zm)	Ген <i>IVR1</i>	Специфичный зонд для идентификации ДНК кукурузы
UDP-GP (St)	Ген фосфорилазы UDP-глюкозы	Специфичный зонд для идентификации ДНК картофеля
SPS (Os)	Ген фосфатсинтазы риса	Специфичный зонд для идентификации ДНК риса
nptII	Ген <i>npt</i>	Специфичный зонд для идентификации маркерного гена <i>nptII</i> из транспозона Tn5
35Sp CaMV	Промотор 35S	Специфичный зонд для идентификации 35S промотора вируса мозаики цветной капусты
35Sp FMV	Промотор FMV	Специфичный зонд для идентификации 35S FMV промотора каулимовируса мозаики норичника
Act1_p	Ген актина <i>ACT1</i>	Специфичный зонд для идентификации промотора гена актина риса
Gus	Ген <i>gus</i>	Специфичный зонд для идентификации маркерного гена <i>gus</i>
nos_t	Терминатор <i>nos</i>	Специфичный зонд для идентификации терминатора <i>nos</i> из агробактерии <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
35St CaMV	Терминатор 35S	Специфичный зонд для идентификации 35S-терминатора вируса мозаики цветной капусты
rbcS_t	Терминатор гена <i>rbcS1</i>	Специфичный зонд для идентификации терминатора гена <i>rbcS1</i> гороха
Ocs_t	Терминатор <i>Ocs</i>	Специфичный зонд для идентификации терминатора <i>ocs</i> из агробактерии <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Bar	Ген <i>bar</i>	Специфичный зонд для идентификации маркерного гена <i>bar</i>

(“Силекс”, Россия); термостабильная “HotTaq” ДНК-полимераза с соответствующим буфером (“Силекс”); флуоресцентный субстрат “IMD515-dUTP” (ИМБ РАН, Россия); наборы для количественного определения ГМ-сои и ГМ-кукурузы методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ; ЗАО “Синтол”).

Олигонуклеотиды для иммобилизации на биочипе и праймеры для амплификации. При выборе зондов и праймеров, идентифицирующих ДНК-мишени трансгенности, использовали созданную в ИФР РАН базу данных по коммерческим ГМ-культурам с учетом, в первую очередь, культур, продукты которых разрешены для использования на территории РФ. Для идентификации ДНК растительного происхождения выбирали олигонуклеотидные зонды и праймеры, специфичные к фрагменту гена *rbcL*, кодирующего большую субъединицу рибулоза-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы. Видоспецифичный полиморфизм в этом же гене использован

для идентификации и дифференциации культур сои, кукурузы, картофеля, риса. Для подтверждения наличия в образце ДНК сои сконструированы праймеры и зонды, специфичные к фрагменту гена лектина *LE1*; для выявления ДНК кукурузы использованы зонды и праймеры, специфичные к гену зеина *IVR1*. Последовательности праймеров и зондов для идентификации ДНК картофеля и риса были комплементарны последовательностям участков гена фосфорилазы УДФ-глюкозы картофеля *UDP-GP* и фосфатсинтазы риса *SPS* соответственно. Описание зондов, использованных для обнаружения ДНК растительного происхождения, идентификации культур и трансгенных мишеней, представлены в табл. 1.

Синтез олигонуклеотидов и праймеров проводили на автоматическом синтезаторе ABI-394 DNA/RNA synthesizer (“Applied Biosystems”, США) с использованием стандартного фосфорамидитного метода и очищали методом обращенно-фазовой

ВЭЖХ (комплекс “Gilson”, Франция). Олигонуклеотиды для иммобилизации в гелевых элементах биочипа содержали спейсер со свободной аминогруппой, которую вводят в процессе синтеза с помощью препарата 5'-Amino-Modifier C6 (“Glen Research”, США).

Выделение ДНК из сырья и продуктов питания проводили с использованием наборов “ДНК-Экстрат” (ЗАО “Синтол”) и “Проба-ЦТАБ” (ООО “НПО ДНК-технология”), согласно рекомендациям производителей. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически, качество полученного препарата (чистоту) оценивали по спектральным характеристикам ($A_{260/280}$ и $A_{260/230}$), а диапазон размеров — по данным электрофореза с маркерами длин ДНК. Для дальнейшего анализа использовали 0.05–1 мкг ДНК, не содержащей примесей, ингибирующих ПЦР (фенол, хлороформ, спирты, детергенты, гепарин и др.). В ряде случаев дополнительную очистку препаратов проводили с использованием микрофлюидных модулей для автоматизированного выделения и очистки ДНК (ИМБ РАН) [20].

Аmplификация исследуемых фрагментов геномов (табл. 1). В две микропробирки добавляли по 5 мкл образца выделенной растительной ДНК (0.05–1 мкг) и по 20 мкл реакционной смеси. С целью повышения эффективности амплификации всех вышеуказанных мишеней мультиплексную ПЦР проводили в двух пробирках; в одну из них вводили набор праймеров, специфичных к генам *rbcL*, *SPS*, *LE1*, *nptII*, *bar*, *gus*, терминатору *nos* (набор ПР-1), в другую — смесь праймеров, специфичных к генам *UDP-GP*, *IVRI*, промотору 35S каулимовируса мозаики норичника (FMV) и 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV), промотору гена *ACT1*, терминаторам 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV), *ocs* и гена *rbcS1* (набор ПР-2). С целью получения преимущественно одноцепочечных фрагментов, комплементарных иммобилизованным олигонуклеотидам, мультиплексную амплификацию проводили по асимметричному типу: в каждой паре праймеров, присутствующих в реакционной смеси, один находился в пятикратном избытке по отношению к другому.

Реакционная смесь (20 мкл) включала 2.5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР (700 мМ Трис-НСl, рН 8.3, 166 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 мМ MgCl_2), 200 мкМ каждого из дНТФ, 1 мкл 100-мМ флуоресцентного субстрата “IMD515-dUTP”, 2 мкл “HotTaq” ДНК-полимеразы и 1 мкл смеси праймеров ПР-1 либо ПР-2. ПЦР проводили в следующем режиме: 95°C в течение 12 мин; затем 55 циклов (95°C 30 с, 51°C 30 с, 72°C 30 с); окончательная достройка при 72°C в течение 10 мин.

Олигонуклеотидный микрочип (биочип) представляет собой пластиковую подложку (рис. 1а), выполненную в формате предметного стекла, на поверх-

ности которой в определенном порядке расположена 31 ячейка полиакриламидного геля в форме полусферы диаметром 100 мкм (обозначены окружностями). В 22 ячейках ковалентно иммобилизованы индивидуальные олигонуклеотиды (табл. 1). Пять ячеек с индексом “О” не содержали ни одного из перечисленных зондов, являясь отрицательным контролем гибридизации. Четыре ячейки с индексом “М” содержали ковалентно связанный флуоресцентный краситель — их использовали для автоматизированного расчета интенсивности флуоресценции ячеек биологического микрочипа после гибридизации. Поверхность биологического микрочипа закрыта специальной составной крышкой с отверстиями (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия), которая, во-первых, вместе с подложкой образует реакционную камеру, предназначенную для проведения гибридизации полученных ПЦР-продуктов с иммобилизованными зондами и, во-вторых, исключает возможность испарения реакционной смеси в процессе гибридизации.

Биочипы изготовлены согласно ранее опубликованному протоколу [21].

Гибридизация на биочипах. По окончании амплификации в реакционную камеру биочипа добавляли 15 мкл гибридизационного буфера (1.5 М гуанидинтиоцианата, 75 мМ HEPES , рН 7.5, 7.5 мМ ЭДТА), по 7.5 мкл реакционной смеси из обеих пробирок, содержащих праймеры ПР-1 и ПР-2. Гибридизацию проводили в течение трех или более часов при 37°C. По окончании гибридизации биочип дважды (по ~30 с) промывали 30 мкл воды, нагретой до 37°C, ополаскивали 96%-ным этанолом, затем водой и высушивали при комнатной температуре.

Регистрация и интерпретация результатов гибридизации. Регистрацию результатов гибридизации проводили на Универсальном аппаратно-программном комплексе (УАПК) для анализа биочипов (ООО “БИОЧИП-ИМБ”), оснащенном программным обеспечением “ImageWare” (ООО “БИОЧИП-ИМБ”) для вычисления и нормировки флуоресцентных сигналов ячеек биочипа.

Интерпретацию результатов гибридизации осуществляли следующим образом. На первом этапе в ячейках определяли достоверные сигналы, при которых возможно образование совершенных гибридизационных дуплексов. Для этого нормированные сигналы интенсивности флуоресценции всех ячеек биочипа сортировали по возрастанию и сравнивали с усредненным (пороговым) сигналом, I_{ref} , в ячейках, не содержащих олигонуклеотидов (ячейки с индексом “О” на рис. 1а). Достоверными считали сигналы, которые превосходили I_{ref} по меньшей мере, в 1.5 раза.

На втором этапе анализировали сигналы в группе ячеек “pDNA”, содержащих олигонуклеотиды, специфичные к гену *rbcL*. При наличии достовер-

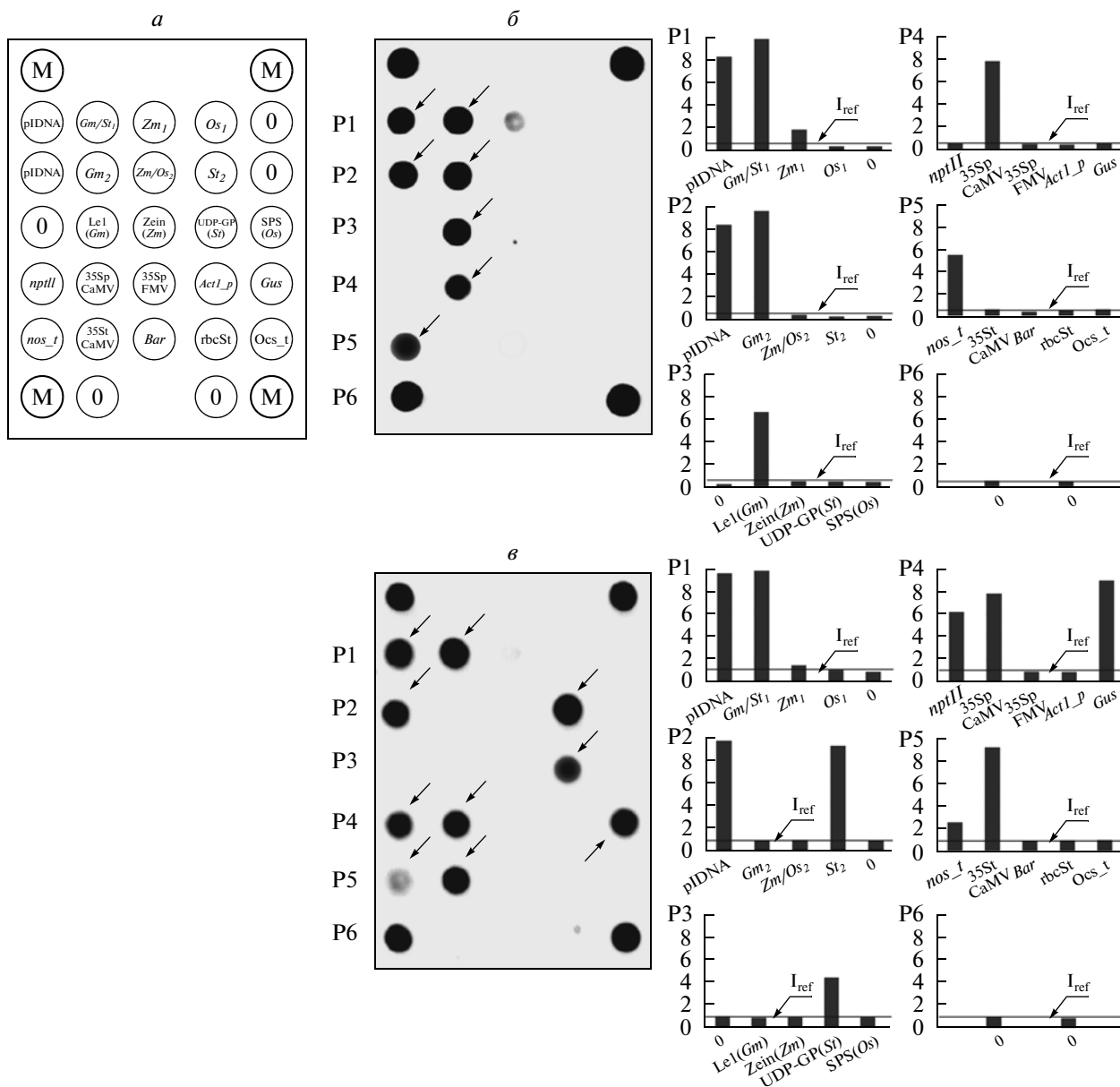


Рис. 1. Схема биочипа для идентификации ГМИ (а). Обозначения ячеек даны в соответствии с названиями олигонуклеотидов в табл. 1. Ячейки с индексом “О” не содержат олигонуклеотидов и выполняют функцию отрицательного контроля. Ячейки с индексом “М” предназначены для правильного позиционирования (захвата изображения) и содержат ковалентно связанный флуоресцентный краситель для автоматизированного расчета интенсивности флуоресценции ячеек биологического микрочипа после гибридизации. Ряды ячеек, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, и элементов отрицательного контроля обозначены индексами Р1–Р6. Флуоресцентное изображение биочипа и гистограммы нормированных сигналов рядов ячеек Р1–Р6 при анализе ДНК трансгенной сои (б) и ДНК картофеля линии 1/2 (в). Ячейки, в которых образовались совершенные гибридизационные дуплексы, на флуоресцентной картине указаны стрелками. Пороговое значение флуоресценции I_{ref} на каждой гистограмме указано сплошной толстой линией.

ных сигналов, т.е. превосходящих I_{ref} не менее чем в 1.5 раза, делали заключение о наличии ДНК растительного происхождения в исследуемом образце. При отсутствии достоверных сигналов в данной группе делали заключение об отсутствии растительной ДНК в образце, и анализ остальных ячеек биочипа не проводили.

На следующем этапе рассматривали достоверные сигналы в двух группах ячеек, содержащих зонды, последовательности которых были комплементарны видоспецифичным последовательностям фрагмента гена *rbcL* (группы обозначены индексами '1' и '2' в табл. 1 и на рис. 1а). В каждой группе ячеек выявляли максимальные сигналы, превосхо-

дящие другие достоверные сигналы в пределах данной группы не менее чем в 1.5 раза, и устанавливали принадлежность анализируемой ДНК к одной (или нескольким) из культур (соя, кукуруза, картофель или рис).

С целью подтверждения присутствия ДНК, выделенной из определенной культуры, анализировали сигналы в ячейках “Le1”, “Zein”, “UDP-GP”, “SPS”, содержащие олигонуклеотиды, специфичные к последовательностям генов, уникальных для генома каждой из культур (соя, кукуруза, картофель или рис). В случае обнаружения достоверного сигнала в данной группе ячеек выдавали окончательное заключение о наличии ДНК определенной культуры в исследуемом материале.

Наконец, проводили анализ сигналов в ячейках “nptII”, “35Sp CaMV”, “35Sp FMV”, “Act1_p”, “Gus”, “nos_t”, “35St CaMV”, “rbcS_t”, “Ocs_t”, “Bar”, содержащих зонды, специфичные к элементам векторных конструкций и маркерным генам — генетическим детерминантам трансгенности. При наличии достоверного сигнала, хотя бы в одном из рассматриваемых элементов, делали заключение о трансгенности исследуемой ДНК с указанием обнаруженной детерминанты трансгенности. При отсутствии достоверных сигналов в указанных ячейках биочипа отмечали, что в анализируемом продукте ГМИ отсутствуют.

ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для количественной идентификации ГМИ в исследуемых образцах проводили на оборудовании “7500 Fast Real-Time PCR System” (“Applied Biosystems”) и “АНК-32” (ЗАО “Синтол”) с использованием наборов для количественной детекции ГМО (ЗАО “Синтол”) в соответствии с Методическими рекомендациями № 02.008-06 от 10 мая 2006 года.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение генетических детерминант трансгенности с использованием олигонуклеотидного микрочипа

Идентификация генетических детерминант трансгенности при использовании биочипов включает ряд последовательных этапов: 1) выделение ДНК из образца пищевого продукта или растительного сырья, 2) стадия мультиплексной ПЦР, 3) гибридизация полученных ПЦР-продуктов (ампликонов) на биочипе, 4) регистрация и интерпретация полученных результатов.

Результаты анализа ДНК сои, содержащей трансгенные элементы, представлены на рис. 1б в виде профиля гибридизации и гистограммы нормированных сигналов ячеек биочипа (ряды Р1–Р6). В соответствии с предложенным алгоритмом интерпретации результатов значение I_{ref} рассчитано как

средний сигнал в ячейках, не содержащих олигонуклеотидов; в данном случае 0.59. Далее проводили поиск ячеек с достоверной величиной сигнала. Сигналы в ячейках “plDNA” (8.43; 8.50) превышали пороговое значение I_{ref} более чем в 1.5 раза; следовательно, исследуемый образец содержал ДНК растительного происхождения.

При анализе двух рядов ячеек, содержащих зонды, комплементарные видоспецифичным последовательностям фрагмента гена *rbcL*, выявлено следующее. В верхнем ряду достоверный сигнал зарегистрирован в ячейках “Gm/St₁” (9.91) и “Zm₁” (1.87), причем сигнал в первой ячейке превосходил сигнал во второй более чем в 1.5 раза. Во втором ряду достоверный сигнал зарегистрирован только в ячейке “Gm₂” (9.37). В обеих группах совершенные гибридационные дуплексы с исследуемым фрагментом гена *rbcL* образованы зондами, специфичными к ДНК сои. Наличие достоверного сигнала (6.72) в элементе биочипа, содержащем зонд, специфичный к фрагменту гена лектина *LE1*, уникального для генома сои, — дополнительное подтверждение присутствия ДНК сои в исследуемом образце.

При анализе элементов, содержащих зонды, специфичные к фрагментам векторных конструкций и маркерных генов, зарегистрированы следующие достоверные сигналы: “35Sp CaMV” (7.88), “nos_t” (5.50). Следовательно, в этих ячейках образовались совершенные гибридационные дуплексы с соответствующими ПЦР-продуктами и, значит, исследуемая ДНК сои трансгенна.

Анализ ДНК картофеля линии 1/2 (рис. 1в) проводили аналогичным образом. В этом случае значение I_{ref} составило 0.88. Достоверные сигналы в ячейках “plDNA” (9.76; 9.68) свидетельствовали о наличии в образце растительной ДНК. Идентификация ДНК картофеля проведена на основании сигналов в ячейках, содержащих видоспецифичные зонды “Gm/St₁” (9.92) и “St₂” (8.86), а также в ячейке “UDP-GP (St)” (4.49) — все они превосходили значение I_{ref} более чем в 1.5 раза. Достоверные сигналы в ячейках, содержащих зонды, специфичные к последовательностям векторных конструкций и маркерных генов, выявлены в элементах “nptII” (6.24), “35Sp CaMV” (7.87), “Gus” (9.06), “nos_t” (2.58) и “35St CaMV” (9.31). Таким образом, можно сделать заключение о трансгенности проанализированного образца ДНК картофеля линии 1/2, причем тестирование на биочипе позволило идентифицировать множественные элементы векторной конструкции в геноме.

Методом мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на микрочипе проанализированы образцы ДНК, выделенные из нетрансгенных культур сои, кукурузы, картофеля и риса. Во всех образцах идентификация культур была проведена однозначно на основе достоверных сигналов яче-

ек, содержащих видоспецифичные зонды, а при анализе на трансгенность ложноположительные результаты зарегистрированы не были. Во всех экспериментах величина сигнала от ячеек, которые содержали олигонуклеотиды, специфичные к маркерам трансгенности (фрагментам векторных конструкций и маркерных генов), превышала значение I_{ref} не более чем на 20%.

Аналитическая чувствительность и оценка эффективности метода при анализе смесей

Аналитическую чувствительность разработанной методики оценивали путем последовательных десятикратных разведений ДНК картофеля трансгенной линии 1/2 с исходной концентрацией 10^7 геном-эквивалентов/мкл и проведением анализа согласно вышеописанной методике. Предложенная методика позволяет воспроизводимо выявлять маркерные гены при концентрации растительной ДНК от 10^4 геном-эквивалентов в 1 мкл образца.

Эффективность выявления ГМИ в препаратах, содержащих смесь трансгенной и нетрансгенной ДНК, оценивали, используя калибровочные образцы, содержащие 0,5, 1, 2, 5% ДНК ГМ-сои GTS 40-3-2 и 0,5, 1, 2, 5% ДНК ГМ-кукурузы MON 810 из референс-наборов для количественного определения ГМ-сои и ГМ-кукурузы (ЗАО “Синтол”). Эксперимент повторяли не менее 5 раз для каждой из ДНК-матриц. При различном процентном содержании ДНК ГМ-культур сои или кукурузы в исследуемом образце идентификацию проводили по сигналам в ячейках “35Sp CaMV” и “nos_t”, содержащих зонды, специфичные к целевым мишеням в геноме ГМ-культур. Результаты представлены на рис. 2. Как свидетельствуют полученные результаты, предел чувствительности разработанного метода составляет 0,5% ГМИ в препарате. При содержании ГМИ менее 0,1% тестирование на биочипах давало, в основном, отрицательный результат. Это позволило исключить из дальнейшего рассмотрения пищевые объекты с низким и сверхнизким содержанием ГМИ, которые, согласно действующему законодательству, не подлежат маркировке.

Тестирование образцов ДНК, выделенных из пищевых продуктов и кормов, с использованием разработанной процедуры и метода ПЦР-РВ

Препараты ДНК, выделенные из 14 пищевых продуктов и кормов, проанализированы с использованием разработанной методики. Результаты анализа на биочипах проверяли методом ПЦР-РВ, оценивая количество трансгенной ДНК в образце с помощью референс-наборов “Соя / GTS 40-3-2 количество”, “Соя / 35S количество” и “Кукуруза/35S количество” (ЗАО “Синтол”).

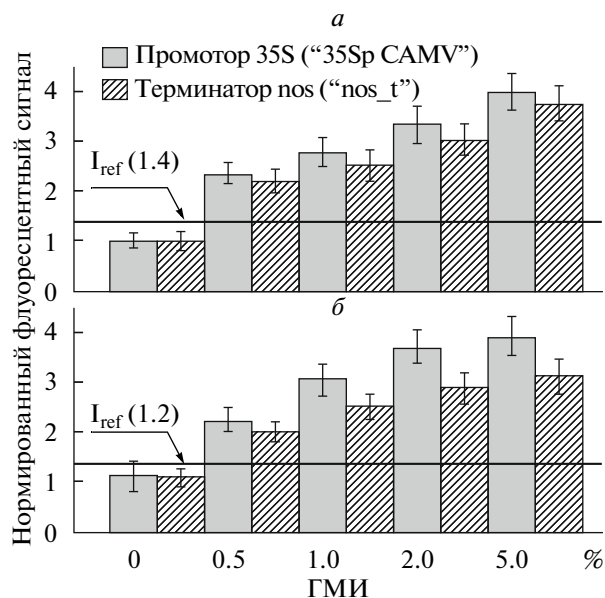


Рис. 2. Гистограммы нормированных флуоресцентных сигналов ячеек “35Sp CaMV” и “nos_t” при анализе калибровочных стандартов (ЗАО “Синтол”), содержащих различное количество (0–5%) ДНК ГМ-кукурузы линии MON 810 (а) и сои Roundup Ready™ линии GTS 40-3-2 (б). Пороговое значение флуоресценции I_{ref} на каждой гистограмме указано сплошной толстой линией.

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что результаты анализа на биочипах по наличию/отсутствию трансгенной ДНК в образце полностью (100%) совпадают с результатами метода ПЦР-РВ. Заметим, что, согласно данным ПЦР-РВ, количество трансгенной ДНК сои или кукурузы в образцах варьировало в широком диапазоне: от 0,22 до 100%.

При анализе образца пищевого продукта “Наггетсы куриные” (Бразилия), № 5 в табл. 2, и корма для собак (“Pronature”, Канада), № 8 там же, выявлены достоверные сигналы в ячейках “Gm/St₁” и “Zm₁”, “Gm₂” и “Zm/OS₂”, различающиеся между собой менее чем в 1,5 раза. Достоверные сигналы также зарегистрированы в элементах биочипа “Le1(Gm)” и “Zein(Zm)”, содержащих олигонуклеотиды, специфичные к генам *LE1* и *IVR1*, уникальным для геномов соответственно сои и кукурузы. Полученный результат гибридизации на биочипе интерпретирован нами как свидетельствующий о наличии ДНК сои и кукурузы в исследуемых образцах. Методом ПЦР-РВ (при использовании соответствующих тест-систем) в образце № 5 показано наличие гена *LE1* сои, а также вставки для линии сои GTS 40-3-2, содержащей промотор 35S CaMV и терминатор nos. Кроме того, подтверждено наличие ДНК кукурузы при отсутствии в ней трансгенных элементов. Результат анализа образца № 8 методом ПЦР-РВ выявил аналогичную ситуацию с той разницей, что идентифицированная ДНК кукурузы

Таблица 2. Результаты анализа образцов ДНК, выделенных из продуктов питания и кормов, на биочипах и методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени

№	Название образца (источник)	Результат анализа на биочипах		Количественная идентификация трансгенной ДНК по результатам ПЦР-РВ	
		принадлежность к культуре	трансгенность (+/-) мишени	трансгенная культура, мишени	наличие (+/-) и количество трансгена (%)
1	Кусочки грудинки цыпленка с сыром в панировке (Бразилия)	Соя	+ 35Sp CAMV, nos_t	Соя, 35Sp CAMV	+ 0.93
2	Крабовые палочки, имитация (ООО "Вичунай-Русь")	»	+ npt, nos_t	Соя, спец. вставка для линии сои GTS-40-3-2	+ 1.17
3	Сосиски "Компуша и Дюймовочка" для детей (ООО "МПЗ КампоМос", Россия)	»	+ 35Sp CAMV, 35St CAMV, nos_t	»	+ 2.9
4	Котлеты "Капустные" постные (ООО "МЛМ-РА", Россия)	»	+ 35Sp CAMV, nos_t	»	+ 36
5	Наггетсы куриные, хрустящие (Бразилия)	»	+ 35Sp CAMV, nos_t	»	+ 18
		Кукуруза		Кукуруза	0
6	Пельмени "Дарья" (ООО "Дарья", Россия)	Соя	+ 35Sp CAMV, nos_t	Соя, 35Sp CAMV	+ 1.2
7	Сухой корм для кошек "Васька" ("Клинвет", Россия)	Соя	+ 35Sp CAMV, nos_t, 35St CAMV	Соя, 35Sp CAMV	+ ~100
8	Сухой корм для собак ("Pronature", Канада)	Кукуруза	+ 35Sp CAMV, nos_t, 35St CAMV	Кукуруза 35Sp CAMV	+ ~100
		Соя		Соя	0
9	Сухой корм для кошек ("Dr. Clauder's", Голландия)	»	+ nos_t, 35St CAMV	Кукуруза 35Sp CAMV	+ 0.22
10	Детское питание Hipp "Bio", пюре цветная капуста (ООО "ХиПП Русь", Россия)	»	+ 35Sp CAMV, 35St CAMV	Соя 35Sp CAMV	+ >10
11	Детское пюре Nestle Абрикос ("Nestle Nutrition", Россия)	»	+ 35Sp CAMV, 35St CAMV	»	+ >10
12	Пюре "Nutricia Baby" брокколи (ООО "Нутриция", Россия)	»	+ 35Sp CAMV, 35St CAMV	»	+ >10
13	Картофель, сорт "Дезире" (Россия)	Картофель	—	—	—
14	Кукуруза, сорт "КР-415" (Россия)	Кукуруза	—	Кукуруза	—

содержала, по меньшей мере, один трансгенный элемент (в данном случае – промотор 35S CaMV), в то время как ДНК сои, также присутствующая в образце, оказалась нетрансгенной. Таким образом, для образцов № 5 и № 8 результаты двух методов анализа: ПЦР-РВ и гибридизации на биочипе – по идентификации растительных компонентов и их трансгенности – следует считать совпадающими.

При тестировании ДНК, выделенной из образца № 9 (корм для кошек “Dr. Clauder’s”, Голландия), результаты по идентификации культуры методом гибридизации на биочипе и ПЦР-РВ не совпали: в первом случае выявлена ДНК сои, а во втором – ДНК кукурузы при отсутствии ДНК сои. Наличие трансгенных элементов в исследуемом образце подтверждено обоими методами; при этом, согласно данным ПЦР-РВ, количество трансгенной ДНК составило 0.22%. Данное обстоятельство, т.е. присутствие ГМИ в количестве ниже предела чувствительности разработанного метода (0.5%), вполне объясняет результат, полученный при идентификации культуры.

Проведенное тестирование показало, что разработанный метод мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией на биочипе может быть использован при массовом скрининге пищевых продуктов и кормов для первичного отбора образцов, содержащих ГМИ, и последующего количественного анализа на содержание детерминант трансгенности методом ПЦР-РВ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящий момент генно-модифицированные продукты становятся постоянной темой для обсуждения как в научном сообществе, так и в средствах массовой информации. Официально разрешенное использование ГМИ в пищевых продуктах и кормах вызывает немало вопросов в обществе в силу отсутствия убедительных доказательств безопасности такой продукции в долгосрочной перспективе. В то же время разработка эффективных и надежных методов идентификации ГМИ позволит осуществлять маркировку генетически модифицированных продуктов и, тем самым, даст потребителю возможность выбора между товарами с различными характеристиками.

Предложенный метод идентификации ГМИ с использованием гидрогелевого биочипа позволяет выявлять до 10 различных трансгенных элементов в ДНК сои, кукурузы, картофеля и риса при содержании трансгенной ДНК менее 1% в исследуемом образце. Это дает возможность определить тип ГМИ и те детерминанты трансгенности, по которым возможен последующий количественный анализ в случае его необходимости. Дизайн праймеров и олигонуклеотидов обеспечивает абсолютную специфичность их взаимодействия с искомыми трансгенными

последовательностями ДНК. При этом большое число детектируемых последовательностей не делает процедуру более сложной в исполнении, так как стадия ПЦР-амплификации фрагментов ДНК и стадия гибридизации на микрочипе выполняются в один прием независимо от числа испытываемых последовательностей. Важно и то, что у трансгенных растений имеются, как правило, несколько разных регуляторных элементов и маркерных генов, встроенных в геном; поэтому при наличии в образце ГМИ флуоресцентный сигнал будет наблюдаться, скорее всего, сразу в нескольких ячейках с зондами. Каждый такой сигнал послужит независимым подтверждением положительного результата тестирования, а значит, снизит вероятность появления ложноположительных результатов. Длины амплифицируемых фрагментов ДНК не превышают 250 п.н. (в среднем около 150 п.н.), что дает возможность выявлять трансгенные последовательности даже в образцах ДНК с высокой степенью деградации. Соединив в себе преимущества двух наиболее чувствительных и специфичных методов идентификации последовательностей ДНК: ПЦР и гибридизации на биочипе с иммобилизованными зондами, разработанный нами метод характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью. С помощью ПЦР концентрации искоемых последовательностей ДНК удается увеличить в миллионы раз, и этого вполне достаточно для регистрации флуоресцентного сигнала.

Предел чувствительности разработанного метода при идентификации трансгенной ДНК составляет 0.5%, что совпадает с данными других методик, основанных на применении мультиплексной ПЦР в комбинации со специализированными ДНК-микрочипами [15, 16, 22, 23]. Такая чувствительность вполне удовлетворяет требованиям к предельному (для маркировки) содержанию ГМИ в продуктах питания и сырье в России и ЕС – 0.9%.

Разработанный метод высокотехнологичен и не требует значительных трудовых затрат. Компоненты для ПЦР могут быть приготовлены заранее, а сама процедура ПЦР занимает не более 2.5 часов. Гибридизация на биочипе проходит без участия персонала, так что ее можно проводить в нерабочее время, например, в течение ночи. Анализ результатов гибридизации производится в автоматическом режиме с использованием специализированного программного обеспечения с алгоритмом интерпретации гибридизационных картин, описанным выше. Срок хранения биочипов с предварительно гибридизованным флуоресцентно-меченым материалом составляет несколько лет, при этом повторная регистрация флуоресценции может быть проведена в любой момент. Преимущества разработанного метода не ограничиваются приведенными примерами, так как есть возможность постоянно дополнять набор ячеек биочипа – по мере освоения

генной инженерией новых регуляторных участков ДНК и генов для создания трансгенных растений.

Тем не менее, следует заметить, что время проведения анализа составляет не менее 6 часов, из которых не менее 3 ч занимает процедура гибридизации на биочипе. Это обусловлено замедленной диффузией фрагментов ДНК в гелевых элементах биочипа по сравнению с кинетикой гибридизации на микрочипах, где зонды иммобилизованы на двумерной поверхности. При этом флуоресцентные сигналы элементов гидрогелевого микрочипа превышают аналогичные на поверхностном микрочипе в 5–20 раз, а по дискриминации между совершенными и несовершенными гибридизационными дуплексами — в 2–4 раза [24]. Благодаря таким характеристикам, для регистрации сигналов на биочипе можно использовать простые и дешевые флуоресцентные анализаторы. Несмотря на простоту процедуры отмывки биочипа, следует строго соблюдать температурно-временные параметры этого этапа, в противном случае наблюдается повышение фонового значения флуоресценции, что может привести к появлению как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов гибридизации. Также следует обратить внимание на опасность контаминации ПЦР-продуктами в ходе процедуры гибридизации, особенно на этапе отмывки биочипа (ее проводят в отдельном помещении, изолированном от места подготовки реакционной смеси и проведения ПЦР). Вышеперечисленные недостатки разработанного метода не стоит рассматривать как ограничения, так как они носят чисто методический характер и их можно избежать при точном соблюдении протокола анализа.

Метод характеризуется высокой воспроизводимостью, простотой выполнения анализа и может быть использован для быстрого массового скрининга на наличие ГМИ в продуктах питания и кормах, реализуемых в торговых сетях (табл. 2). Назначение этого метода — идентификация заведомо трансгенных образцов в большой выборке с целью их последующего количественного анализа на содержание трансгена [25]. Можно с уверенностью сказать, что разработанные методики на основе биочипов имеют хорошие перспективы и уже нашли успешное применение не только в скрининговых работах, но и в фундаментальных научных исследованиях, в частности для подтверждения встраивания того или иного комплекса целевых и маркерных генов в геном растений [26, 27].

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Биологическое разнообразие”, подпрограммы “Генофонды и генетическое разнообразие” и государственного контракта с Министерством науки и образования № 02.522.11.2019.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bevan M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**, 8711–8721.
2. Романов Г.А. 2000. Генетическая инженерия растений и пути решения проблемы биобезопасности. *Физиология растений.* **47**, 343–353.
3. James C. 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. *ISAAA Brief Report 42-2010*.
4. Кузнецов В.В., Куликов А.М. 2005. Генетически модифицированные организмы и полученные из них продукты: реальные и потенциальные риски. *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. Хим. Об-ва им. Д.И. Менделеева).* **XLIX**, 70–83.
5. Ahmed F.E. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol.* **20**, 215–223.
6. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. 2003. *OJEU.* **L268**, 1–22.
7. Sparrow P.A. 2010. GM risk assessment. *Mol. Biotechnol.* **44**, 267–275.
8. Онищенко Г.Г. 2007. О надзоре за оборотом пищевых продуктов, содержащих ГМО. *Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30.11.2007. № 80*.
9. Lipp M., Brodmann P., Pietsch K., et al. 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *J. AOAC Int.* **82**, 923–928.
10. Holst-Jensen A., Ronning S.B., Lovseth A., Berdal K.G. 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.* **375**, 985–993.
11. Dorries H., Remus I., Gronewald A., Gronewald C., Berghof-Jager K. 2010. Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 2043–2054.
12. Elenis D., Kalogianni D., Glynou K., Ioannou P., Christopoulos T. 2008. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**, 347–354.
13. Leimanis S., Hernandez M., Fernandez S., Boyer F., Burns M., Bruderer S., Glouden T., Harris N., Kaeppli O., Philipp P., Pla M., Puigdomenech P., Vaitilingom M., Bertheau Y., Remacle J. 2006. A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Mol. Biol.* **61**, 123–139.
14. Xu J., Miao H., Wu H., Huang W., Tang R., Qiu M., Wen J., Zhu S., Li Y. 2006. Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 71–77.
15. Schmidt A., Sahota R., Pope D., Lawrence T., Belton M., Rott M. 2008. Detection of genetically modified canola using multiplex PCR coupled with oligonucleotide microarray hybridization. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 6791–6800.
16. Kim J., Kim S., Lee H., Kim Y., Kim H. 2010. An event-specific DNA microarray to identify genetically modified organisms in processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6018–6026.

17. von Gotz F. 2010. See what you eat – broad GMO screening with microarrays. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 1961–1967.
18. Колчинский А.М., Барский В.Е., Заседателев А.С. 2007. Биочипы в лаборатории А.Д. Мирзабекова: 1988–2007 гг. *Молекуляр. биология.* **41**, 757–764.
19. Мирзабеков А.Д., Грядунов Д.А., Михайлович В.М., Заседателев А.С., Романов Г.А., Кузнецов В.В., Цыдендамбаев В.Д., Крылова Е.М. 2006. Способ идентификации трансгенных последовательностей ДНК в растительном материале и продуктах на его основе, набор олигонуклеотидов и биочип для осуществления этого способа. Патент 2270254 (РФ). *Б.И. №5*.
20. Ходаков Д.А., Мамаев Д.Д., Дементьева Е.И., Филатов И.В., Юрасов Д.А., Черепанов А.И., Василисков В.А., Смолдовская О.В., Грядунов Д.А., Михайлович В.М., Заседателев А.С., Макаров А.А. 2010. Микрофлюидный модуль для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов. *Докл. Акад. Наук.* **435**, 121–125.
21. Rubina A., Pan'kov S., Dementieva E., Pen'kov D., Butygin A., Vasiliskov V., Chudinov A., Mikheikin A., Mikhailovich V., Mirzabekov A. 2004. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Analyt. Biochem.* **325**, 92–106.
22. Zhou P., Zhang, J., You Y., Wu Y. 2008. Detection of genetically modified crops by combination of multiplex PCR and low-density DNA microarray. *Biomed. Environ. Sci.* **21**, 53–62.
23. Harikai N., Saito S., Abe M., Kondo K., Kitta K., Akiyama H., Teshima R., Kinoshita K. 2009. Optical detection of specific genes for genetically modified soybean and maize using multiplex PCR coupled with primer extension on a plastic plate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1886–1889.
24. Sorokin N.V., Chechetkin V.R., Livshits M.A., Pan'kov S.V., Donnikov M.Y., Gryadunov D.A., Lapa S.A., Zasedatelev A.S. 2005. Discrimination between perfect and mismatched duplexes with oligonucleotide gel microchips: role of thermodynamic and kinetic effects during hybridization. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **22**, 725–733.
25. Колотовкина Я.Б., Наумкина Е.М., Чижова С.И., Гетман И.А., Кузнецов В.В., Цыдендамбаев В.Д., Кузнецов Вл.В., Романов Г.А. 2008. Методы идентификации и мониторинг трансгенных компонентов в продуктах питания. *Докл. РАСХН.* **5**, 44–47.
26. Наумкина Е.М., Болякина Ю.П., Романов Г.А. 2007. Органоспецифичность и индуцибельность функционирования промотора гена пататина класса I картофеля в трансгенном арабидопсисе. *Физиология растений.* **54**, 397–408.
27. Баврина Т.В., Миляева Э.Л., Гетман И.А., Романов Г.А. 2007. Особенности проявления и наследования TRD1-фенотипа у инсерционного мутанта табака с длительным периодом цветения. *Физиология растений.* **54**, 730–737.