

# Генно-инженерно-модифицированные организмы. Методы детекции и идентификации.

Французов Павел Александрович  
ООО «ГенБит», Москва



# ГЕННО-ИНЖЕНЕРНО- МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОРГАНИЗМЫ (ГМО)

**Официальное определение (Федеральный закон "О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности" от 05.07.1996 N 86-ФЗ):**

«организм или несколько организмов, любое неклеточное, одноклеточное или многоклеточное образование, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генетической инженерии и содержащие генно-инженерный материал, в т.ч. гены, их фрагменты или комбинации генов»

**ГМО** – это организм, обладающий новой комбинацией генетического материала, полученной благодаря использованию современной биотехнологии.



# ВИДЫ ГМО



## ГМО растительного происхождения:

- устойчивые к гербицидам
- устойчивые к насекомым вредителям
- измененный химический состав



## ГМО микробного происхождения:

- бактерии, синтезирующие инсулин
- бактерии, синтезирующие ферменты



## ГМО животного происхождения:

- лактоферрин (козы)
- быстрорастущий лосось
- флуоресцирующие кошки

# ОСНОВНЫЕ ГМ-КУЛЬТУРЫ, ПРОИЗВОДИМЫЕ В МИРЕ



**ХЛОПЧАТНИК**  
(12%)



**РАПС**  
(5%)

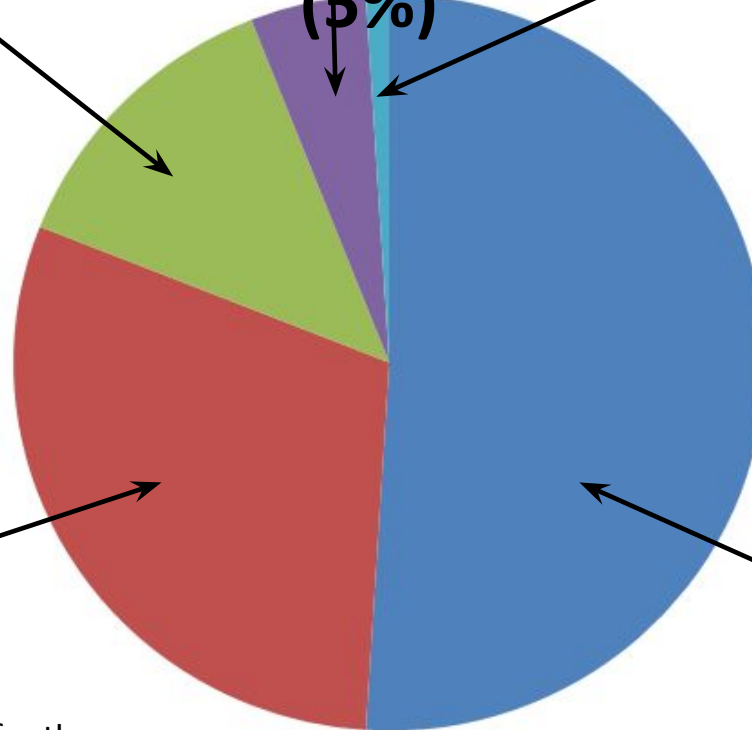
**ДРУГИЕ  
КУЛЬТУРЫ**  
(1%)



**КУКУРУЗА**  
(33%)

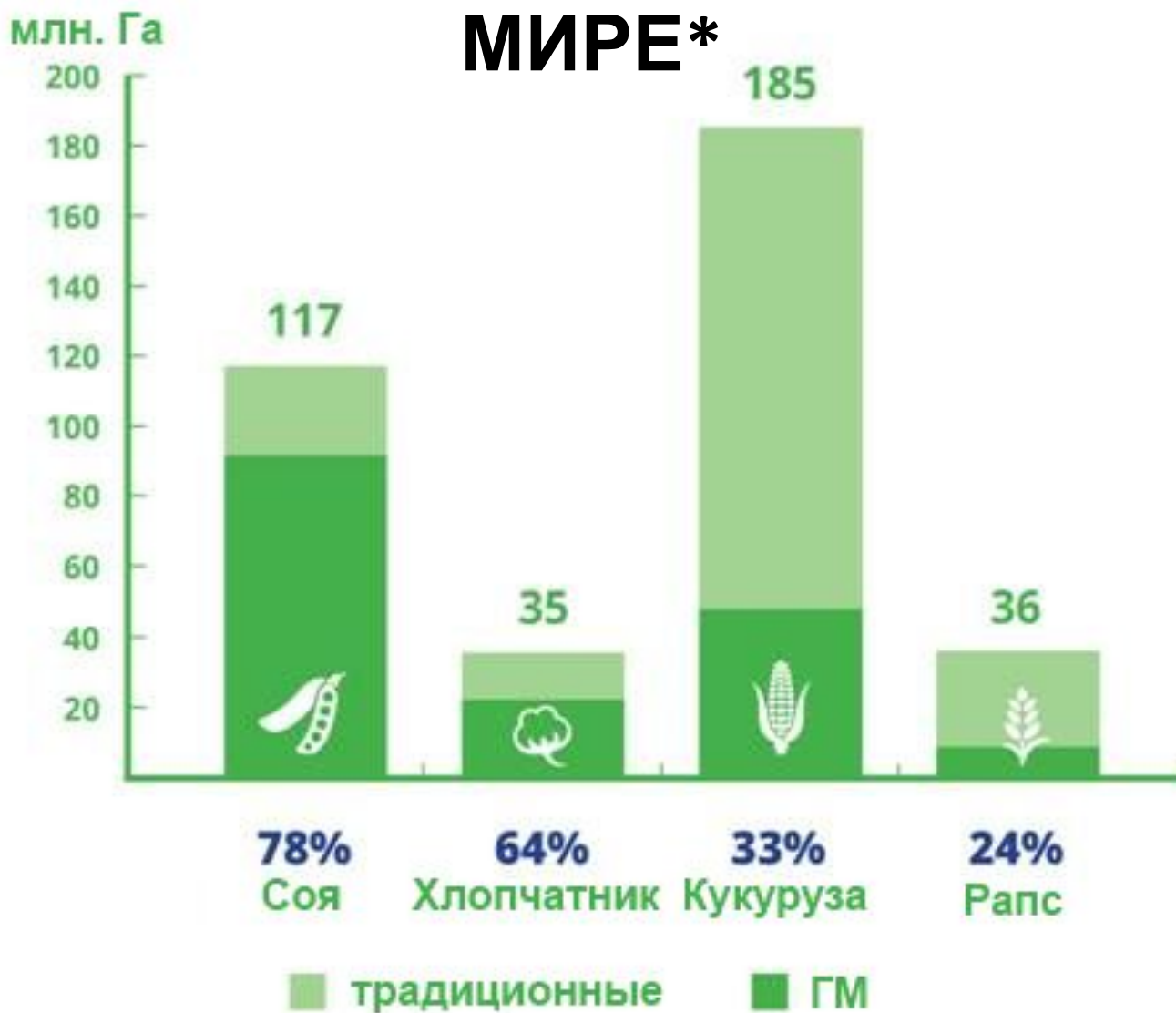


**СОЯ**  
(50%)



\* - по данным International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)

# ДОЛЯ ГМ-КУЛЬТУР, ПРОИЗВОДИМЫХ В МИРЕ\*

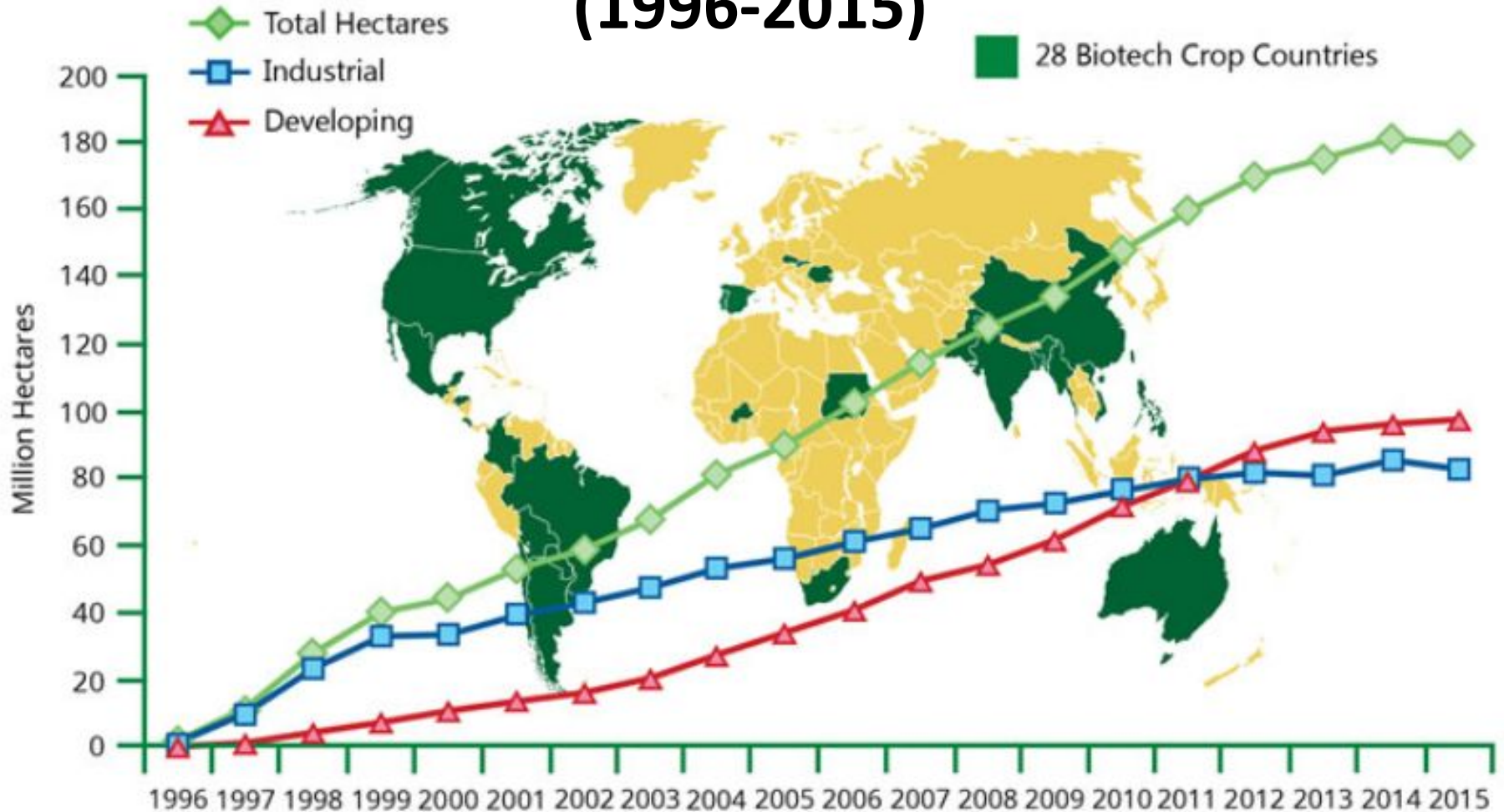


\* - по данным International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)





# МИРОВОЕ ПРОИЗВОДСТВО ГМ- СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (1996-2015)



\* - ГОДОВОЙ ОТЧЕТ International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), 2016



# СТРАНЫ, **ВЫРАЩИВАВШИЕ**, **ИМПОРТИРОВАВШИЕ** И ПРОВОДИВШИЕ ПОЛЕВЫЕ ИСПЫТАНИЯ ГМО (2014)

● **ВЫРАЩИВАНИЕ**

● **ИМПОРТ**

● **ПОЛЕВЫЕ ИСПЫТАНИЯ**



# ГМО В РОССИИ

## Трансформационные события

Соя: 8 линий + 1 комбинированное событие (GTS 40-3-2, MON89788, MON87701, A2704-12, A5547-127, BPS-CV127-9, SYHT0H2, FG72, MON87701xMON89788)



Кукуруза: 14 линий (MON810, MON88017, MON863, MON89034, Bt11, MIR162, MIR604, GA21, NK603, T25, TC1507, 3272, 5307, MZHGOJG\*)



Рис: 1 линия (LLRICE62)



Сахарная свёкла: 1 линия (H7-1)

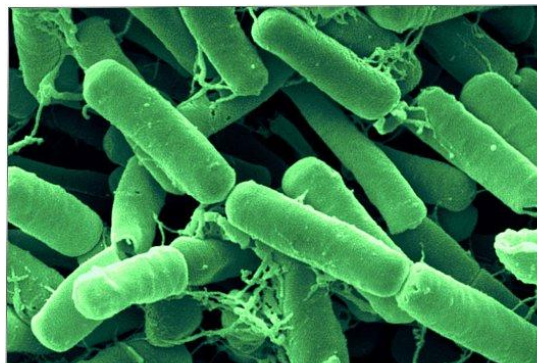


\* - линия (трансформационное событие) находится в процессе регистрации





# ГМО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ



Организм-донор

Выделени  
гена



Целевой  
ген

Трансформация  
(агробактерии,  
вирусы,  
бомбардировка  
микрочастицами)



Модифицируемый  
организм

Трансформационное событие –  
присутствие в геноме ГМО  
определенной **генетической**  
**конструкции** имеющей **конкретную**  
**локализацию**

# НОВЫЕ ГЕНЫ И ПРИЗНАКИ ГМ РАСТЕНИЙ

## 1. Устойчивость к гербицид



## 2. Устойчивость к вредителям:



## 3. Изменение качества продукта:



- гены **cp4 epsps**, **merpsps**, **2merpsps**, **gox** – обеспечивают устойчивость к глифосату (Roundup)
- гены **pat**, **bar** – обеспечивают устойчивость к глюфосинату аммония (Liberty)
- гены дельта-эндотоксинов (**cry**) *B. thuringiensis* – обеспечивают устойчивость к различным родам насекомых (например, **cry1Ab** – чешуекрылые, **cry3A** - жесткокрылые)
- ген **Bay TE** – изменение жирнокислотного состава семян рапса
- ген **gbss** – изменение соотношения амилоза/амилопектин картофеля
- ген **PG (полигалактуроназа)** (antisense) – лежкость томатов

# ГМО. СТРУКТУРА ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ

В клетке сам по себе ген не экспрессируется (работает) не будет, для экспрессии необходимы **вспомогательные генетические элементы**:

- **ПРОМОТОР** – это последовательность нуклеотидов, узнаваемая РНК-полимеразой как метка для начала транскрипции
- **ТЕРМИНАТОР** – это последовательность нуклеотидов, узнаваемая РНК-полимеразой как сигнал к прекращению синтеза молекулы РНК
- **ГЕННО-ИНЖЕНЕРНАЯ КОНСТРУКЦИЯ** – это функциональная единица (последовательность ДНК), обеспечивающая перенос и функционирование целевого гена (генов) в новый организм
- **КАССЕТА ЭКСПРЕССИИ** – это фрагмент ДНК, содержащий ген и все необходимые для его экспрессии генетические элементы.



# ОТКУДА БЕРУТСЯ НОВЫЕ ГЕНЫ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ?

## Целевые

### гены

- Бактерии: **cp4 epsps** – *A. tumefaciens* штамм CP4  
**bar** - *Streptomyces hydroscopicus*  
**gox** - *Ochrobactrum anthropi*  
Гены **cry** – *B. thuringiensis* (различные штаммы)
- Растения: **mepps** – *Zea mays* (кукуруза)  
**PG (antisense)** – *Solanum lycopersicum* (томат, **собственный ген!**)

## Маркерные

### гены

- Бактерии: **nptII** – *E. coli*  
**bla** – *E. coli*  
**GUS** – *E. coli*

# ОТКУДА БЕРУТСЯ НОВЫЕ ГЕНЫ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ?

## Промотор

- ❑ Вирусы: **p35S** – вирус мозаики цветной капусты  
**FMV** – вирус мозаики норичника
- ❑ Бактерии: **pNOS** – *A. tumefaciens*
- ❑ Растения: **pUbiZM1** – *Zea mays* (кукуруза)  
**pSsuAra** – *Arabidopsis thaliana*  
**pActin1** – *Oryza sativa* (рис)

## Терминатор

- ❑ Вирусы: **t35S** – вирус мозаики цветной капусты
- ❑ Бактерии: **tNOS, tOCS, tg7** – *A. tumefaciens*
- ❑ Растения: **tE9** – *Pisum sativum* (горох)

**Трансформационные события также могут содержать  
НАТИВНЫЕ (собственные) регуляторные элементы вида**





# НА КАКИХ УРОВНЯХ МОЖНО ИДЕНТИФИЦИРОВАТЬ ГМО?

Центральная догма  
молекулярной  
биологии

ДНК

РНК

белок

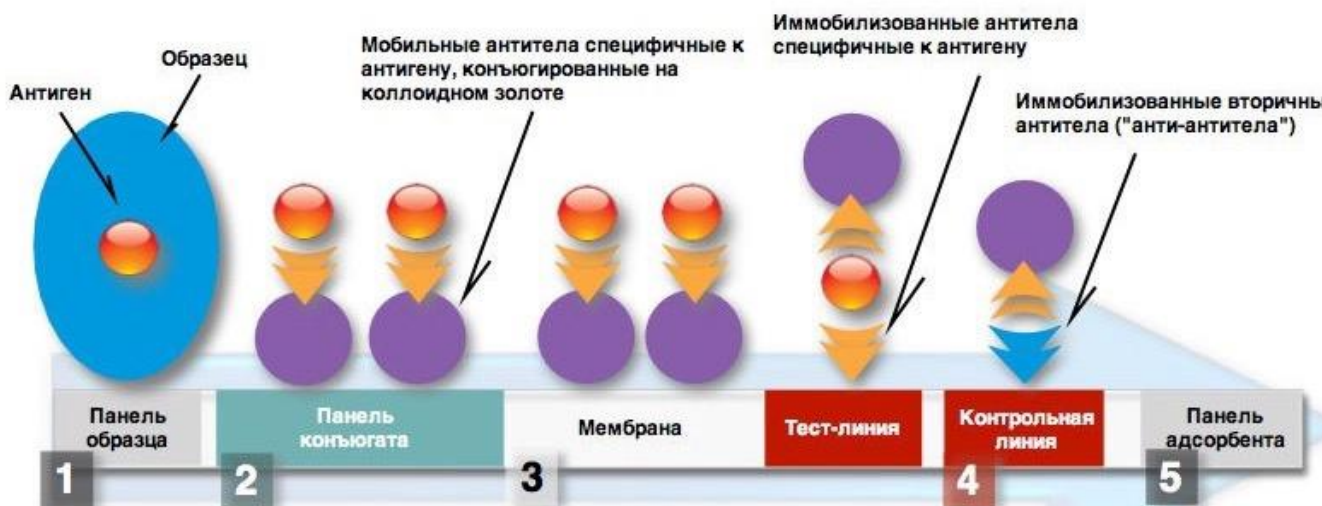
Полимеразная цепная реакция  
(ПЦР)

Секвенирование (определение  
последовательности ДНК)

Иммуноферментный  
анализ

Иммунохроматография

# МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГМО: ИММУНОХРОМАТОГРАФИЯ

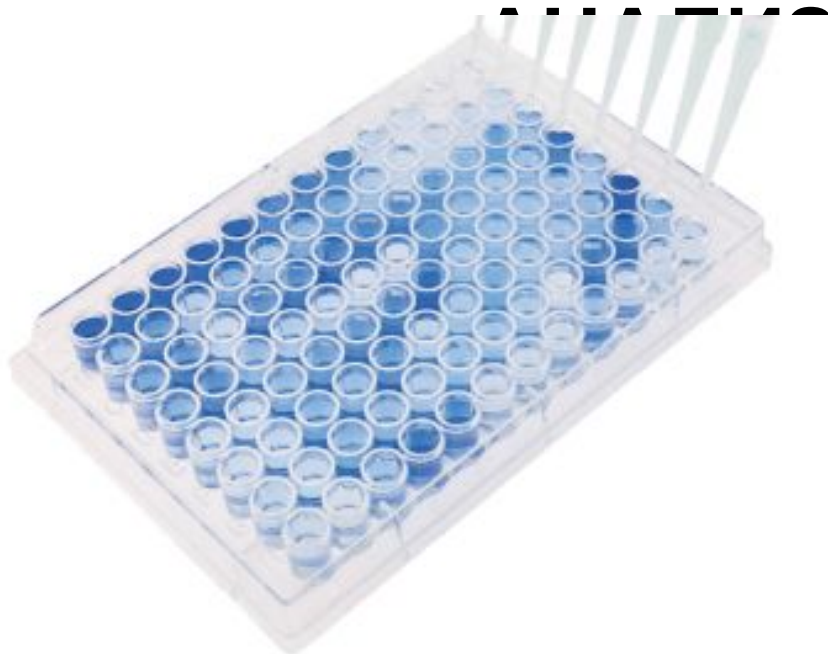


- 1** Образец попадает в панель и движется по ней за счёт капиллярных сил
- 2** Антитела, конъюгированные на коллоидном золоте, распознают эпитопы антигена
- 3** Комплекс движется с буфером до иммобилизованных антител, распознающих эпитопы антигена

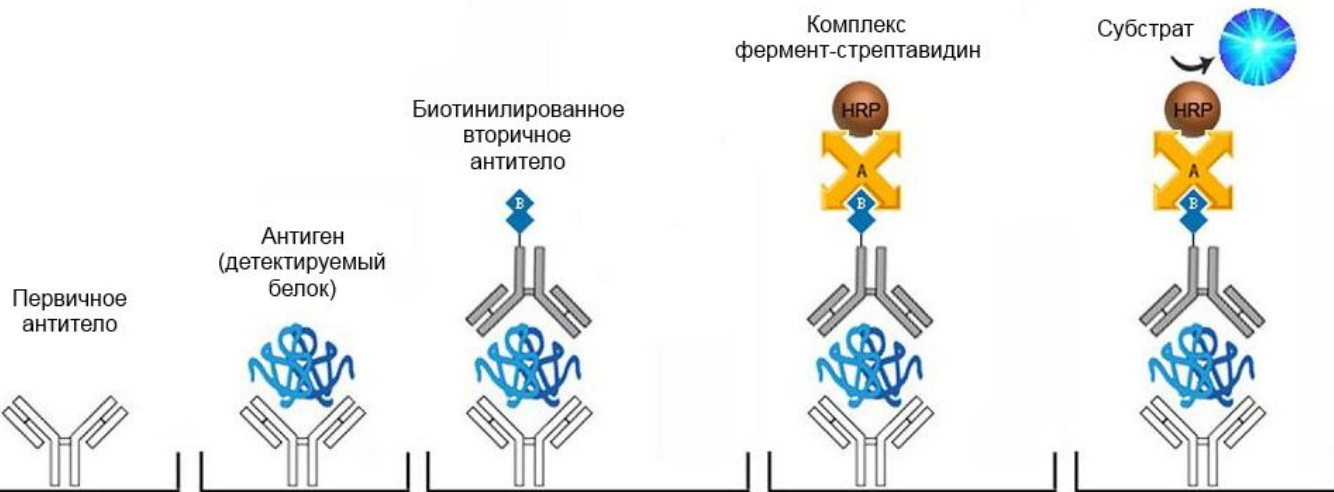
- 4** Избыток антител связывается вторичными антителами ("анти-антителами")
- 5** Избыток буфера поглощается адсорбентом

- Экспресс-метод
- Простота
- Нетребовательность к оборудованию
- Определяется только один белок
- Относительно невысокая чувствительность
- Невозможность идентификации трансформационного события
- В пересчете на реакцию дороже ПЦР

# МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГМО: ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ



- Простота
- Нетребовательность к оборудованию
- Определяется только один белок
- Относительно невысокая чувствительность
- Невозможность идентификации трансформационного события



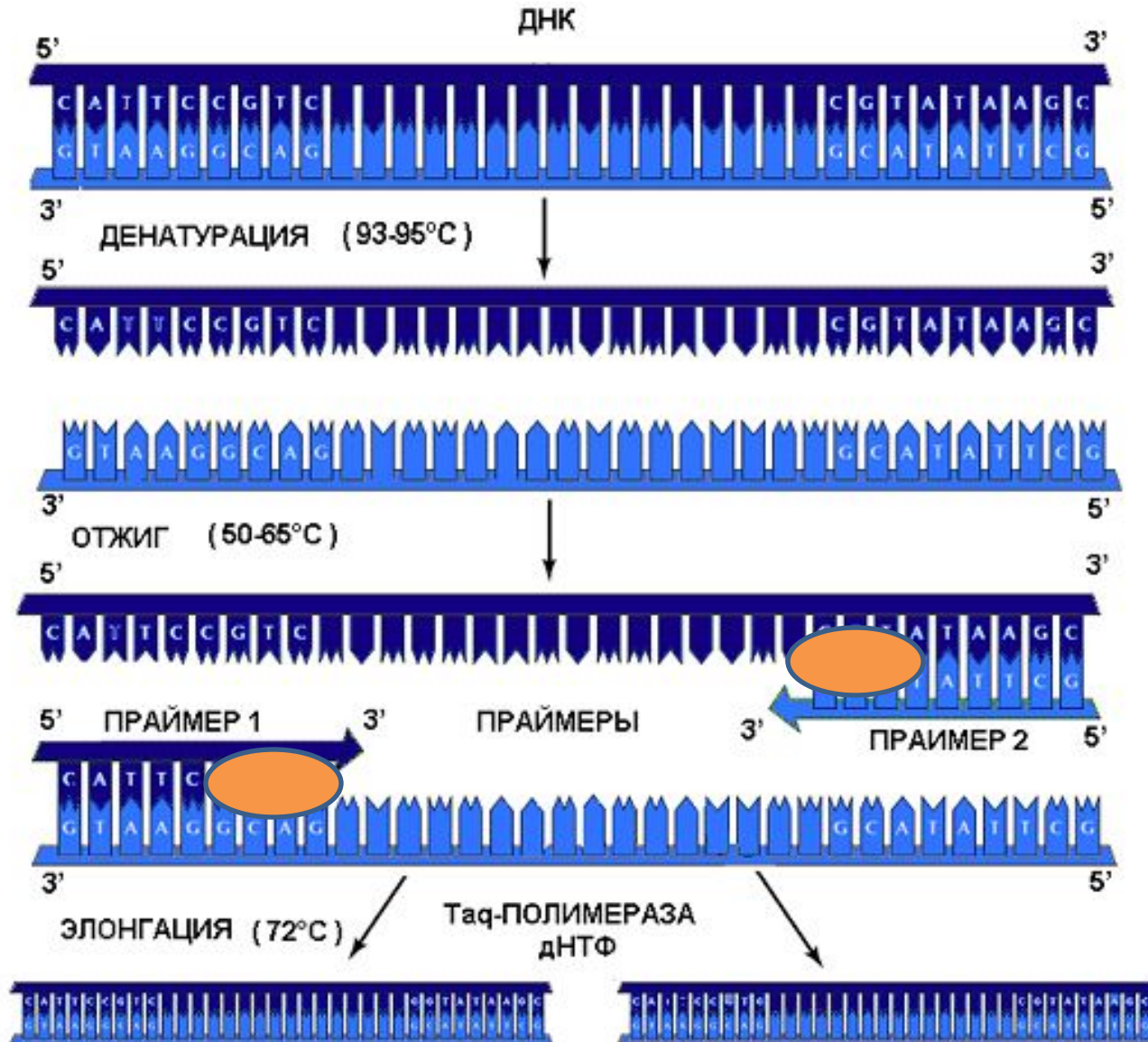
# ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

— метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов ДНК в биологическом материале (пробе).

ПЦР основана на **амплификации** — избыточной избирательной репликации (размножении) целевого участка ДНК.

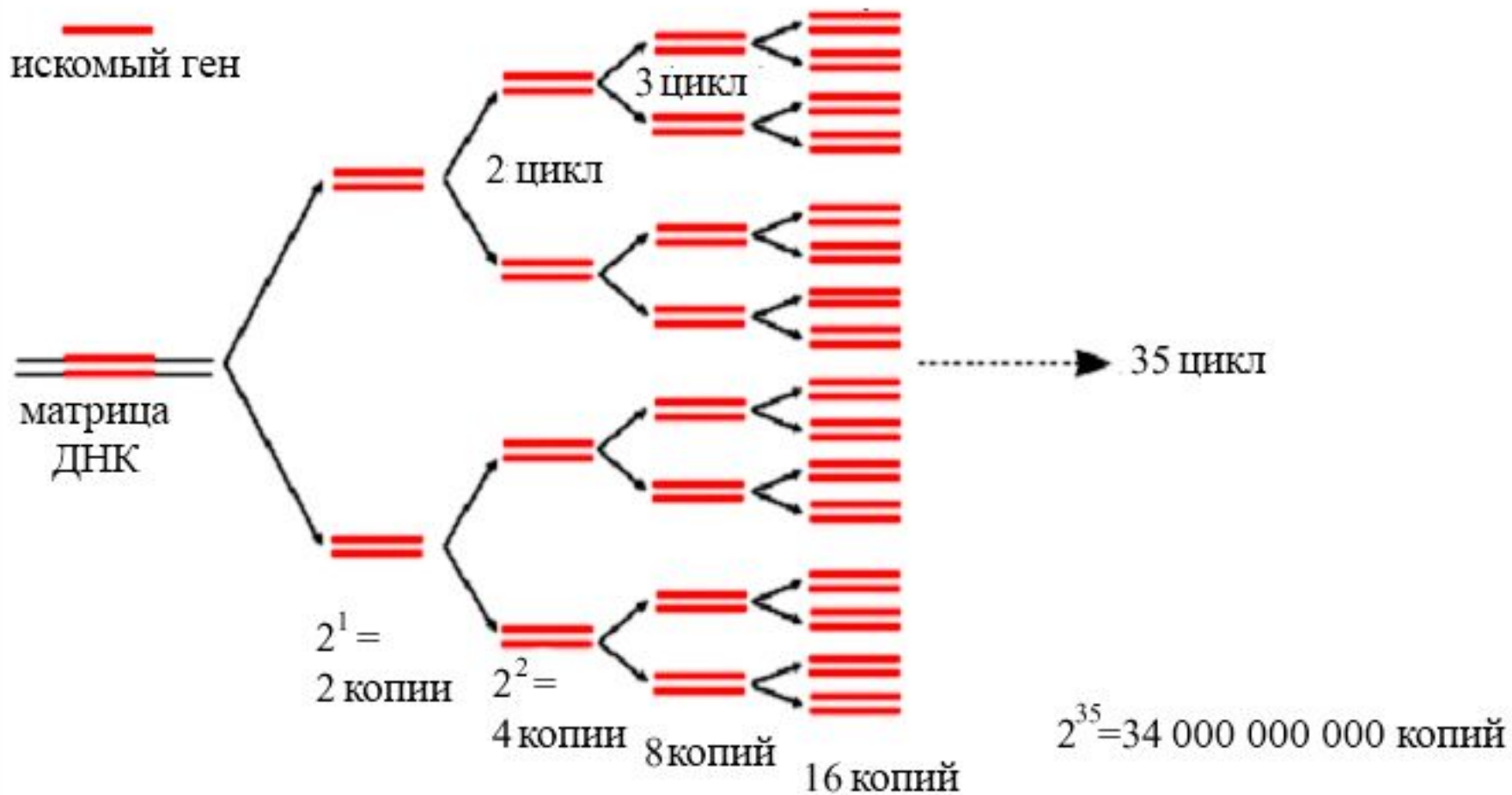


# СТАДИИ ПЦР





# СХЕМА ПЦР



# ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ ПЦР

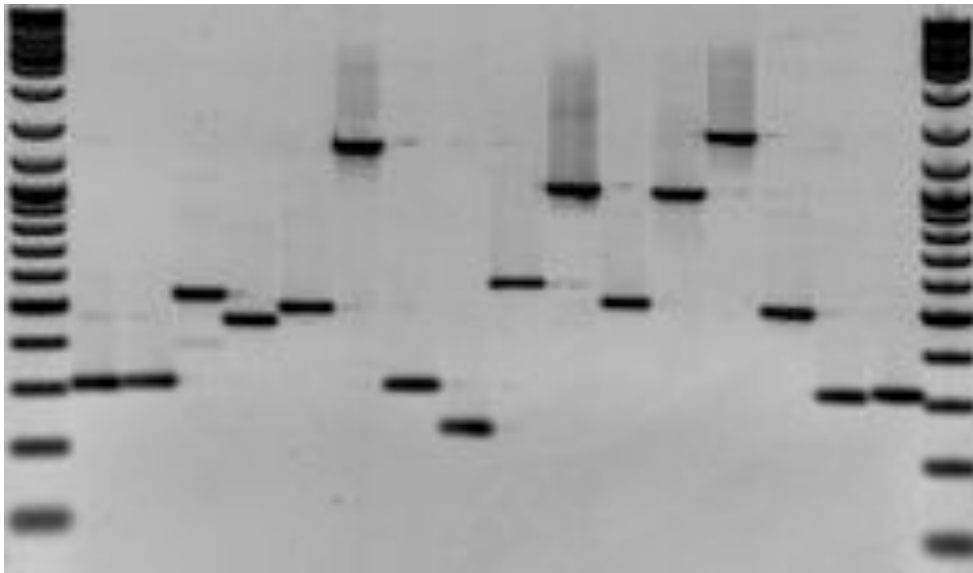
1. Традиционный метод: гель-электрофорез
2. Флуоресцентные методы детекции:
  - Интеркалирующие красители
  - Флуоресцентные зонды

# Детекция продуктов ПЦР

## Гель - электрофорез

ДНК – заряженная молекула, причем ее заряд прямо пропорционален длине молекулы.

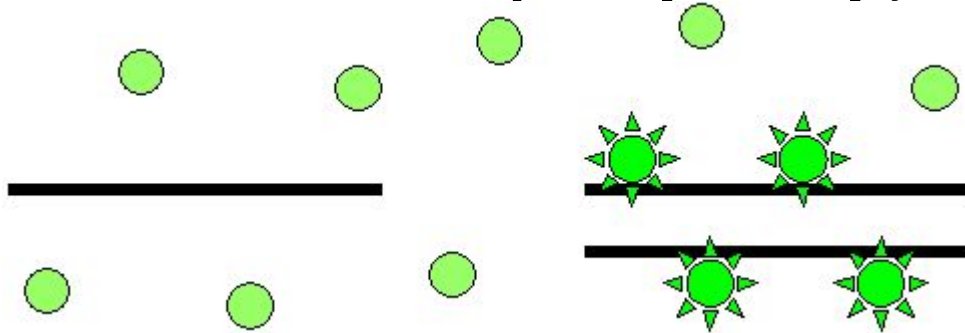
Гель-электрофорез продуктов ПЦР основан на разделении фрагментов ДНК разной длины в электрическом поле



- трудоемкость
- дороговизна оборудования
- длительный
- высокая вероятность контаминации
- повышенные требования к организации ПЦР-лаборатории
- только качественная детекция

# Детекция продуктов ПЦР

## Интеркалирующие красители (например, SYBR Green)

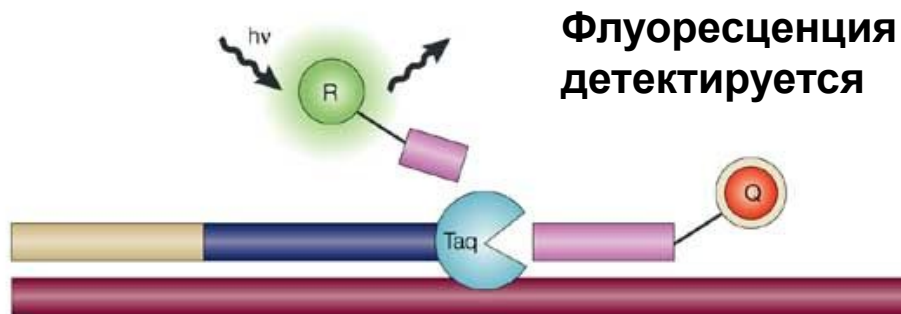
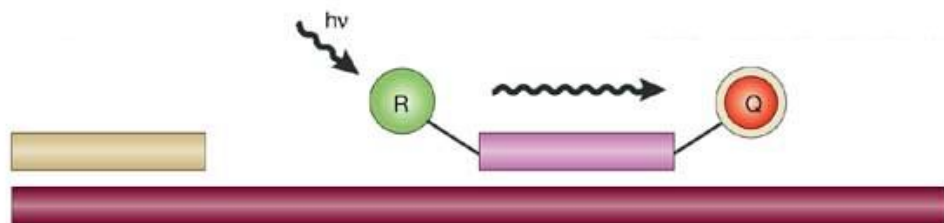
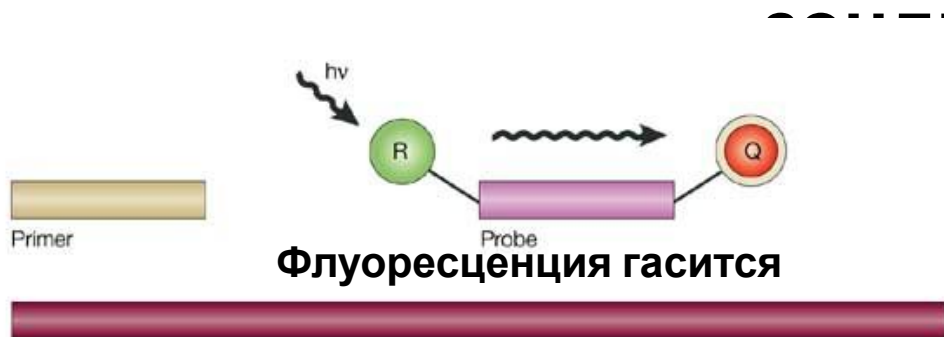


- Краситель в растворенном состоянии флуоресцирует слабо
- Краситель не связывается с одноцепочечной ДНК
- При связывании с двухцепочечной ДНК интенсивность флуоресценции резко повышается

- более дешевое оборудование
- неспецифическая детекция
- более низкая вероятность контаминации по сравнению с детекцией в геле

# ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ ПЦР

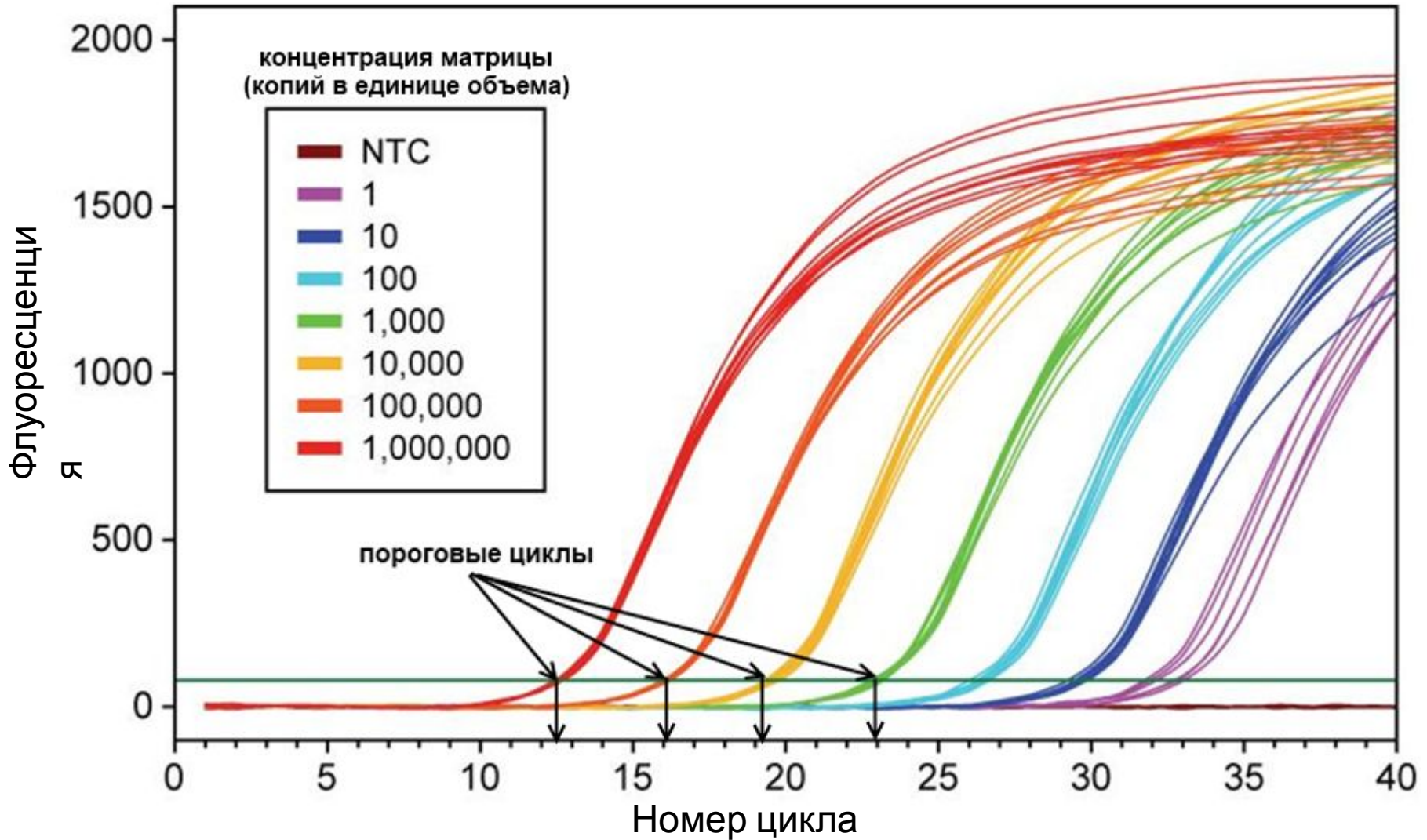
## Флуоресцентные



- олигонуклеотидный зонд обеспечивает специфичность детекции
- низкая вероятность контаминации
- возможность количественной детекции
- возможность постановки нескольких реакций в одном реакционном объеме



# ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ



# ГМО. МИШЕНИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ



1. Элемент-специфичная детекция (элемент-специфичные тест-системы)
2. Конструкт-специфичная детекция (конструкт-специфичные тест-системы)
3. Событие-специфичная детекция (событие-специфичные тест-системы)

# ГМО. СТРАТЕГИЯ ВЫЯВЛЕНИЯ

До недавнего времени первым этапом выявления ГМО являлся **скрининг**, направленный на выявление **35S-промоторов** вируса мозаики цветной капусты (CaMV), вируса мозаики норичника (FMV) и **терминатора NOS**

ГМ культура	Линий зарегистрировано в России	Содержат в геноме 35S (CaMV, FMV) или tNOS	Содержат в геноме и 35S и tNOS
Соя	8	6	2
Кукуруза	14	14	6
Хлопчатник	-	-	-
Рапс	-	-	-
Рис	1	1	0
Сахарная свекла	1	1	0

Для надежной детекции ГМО необходим **расширенный набор** генетических маркеров



# МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

1. ГОСТ Р 53244-2008 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот.
2. ГОСТ Р 56058-2014 Корма и кормовые добавки. Методы идентификации и количественного определения ГМО растительного происхождения.
3. Методические указания МУ 4.2.2008-05 Метод идентификации генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения с применением ферментного анализа на биологическом микрочипе.
4. Методические указания МУК 4.2.2304-07 Методы идентификации и количественного определения генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения.
5. Методические указания МУК 4.2.3390—16 Детекция и идентификация ГМО растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции в матричном формате. *Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 3 августа 2017 г.*



# ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГМО ПО КОМБИНАЦИИ ВЫЯВЛЕННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ

База данных ГМО Center for Environmental Risk Assessment

[ЭЛЕМЕНТОВ  
\(http://cera-gmc.org/GMCropDatabase\)](http://cera-gmc.org/GMCropDatabase)



Center for  
Environmental  
Risk Assessment

## GM Crop Database

Query page

Synopsis

Event ID: -Any-  
4, 11, 15, 16  
19-51A  
23-18-17, 23-198  
35 1 N

Overview of all products in  
database

Crop Plant: -Any-  
Alfalfa  
Apple  
Argentine Canola  
Carnation

### Query Options

New Database Query

Go to Event

Please select

Trait: -Any-  
Agronomic performance  
Amino acid composition  
Fatty acid composition  
Fertility restoration

### Help

How To Use the GM Crop Database

Inserted Gene: -Any-  
5AT  
aad  
aad-1  
aad-12

Type of Approval: -Any-  
Environmental release  
Food safety  
Livestock feed



Country: -Any-  
Argentina  
Australia  
Brazil  
Burkina Faso

Original Developer: -Any-  
Agriculture & Agri-Food Canada  
Agritope Inc.  
Asgrow (USA); Seminis Vegetable Inc. (Canada)  
Aventis CropScience

Year(s) Approved: From To

BY SUBMITTING, YOU AGREE TO THE TERMS OF USE





# ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГМО ПО КОМБИНАЦИИ ВЫЯВЛЕННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

База данных ГМО International Service for Acquisition of Agri-biotech Applications  
(<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>)

The screenshot shows the ISAAA GM Approval Database website. At the top, there is a navigation bar with links for 'Contact', 'Purchase Publications', 'Site Map', and a 'Google Custom Search' box. The main header features the ISAAA logo and the text 'INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRIBIOTECH APPLICATIONS'. A 'Join our new Crop Biotech Update mailing list' button is also present. Below the header is a menu with categories like 'ISAAA in Brief', 'ISAAA Programs', 'Knowledge Center', 'Biotech Information Resources', 'GM Approval Database', 'ISAAA Blog', and 'Donate'. The main content area is titled 'GM Approval Database' and includes a description of the database's purpose, a 'Latest Update' section dated March 2, 2017, and an 'Advanced Search (Beta)' section with filters for Crop, Commercial Trait, Developer, Country, and Type of Approval. A 'Quick Links' section at the bottom provides links to display events by commercial trait and by developer.

**GM Plants**

- Alfalfa
- Apple
- Argentine Canola
- Bean
- Carnation
- Chicory
- Cotton
- Creeping Bentgrass
- Eggplant
- Eucalyptus
- Flax
- Maize
- Melon
- Papaya
- Petunia
- Plum
- Polish canola
- Poplar
- Potato
- Rice
- Rose
- Soybean
- Squash
- Sugar Beet
- Sugarcane
- Sweet pepper
- Tobacco
- Tomato
- Wheat

**GM Approval Database**

ISAAA presents an easy to use database of Biotech/GM crop approvals for various biotechnology stakeholders. It features the Biotech/GM crop events and traits that have been approved for commercialization and planting and/or for import for food and feed use with a short description of the crop and the trait. Entries in the database were sourced principally from Biotechnology Clearing House of approving countries and from country regulatory websites. We invite corrections, additions/deletions, and suggestions for the improvement of the database. Contact us at [gmapproval@isaaa.org](mailto:gmapproval@isaaa.org) or fill out our [feedback form](#).

**Latest Update:**

March 2, 2017 Australia and New Zealand approved the Innate potato event [E12](#) (stacked PQ) for food use. [See more updates](#)

Jump to an Event:

**Advanced Search (Beta)**

Crop:

Commercial Trait:

Developer:

Country:

Type of Approval:

**Quick Links:**


Display events by commercial trait	Display events by developer
<ul style="list-style-type: none"><li>Abiotic Stress Tolerance</li><li>Altered Growth/Yield</li><li>Disease Resistance</li><li>Herbicide Tolerance</li><li>Insect Resistance</li><li>Modified Product Quality</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Agricultural Biotech Research Institute (Iran)</li><li>Agrihope Inc. (USA)</li><li>BASF</li><li>Bayer CropScience (including fully and partly owned companies)</li><li>Bayer CropScience and MS Technologies LLC</li></ul>

**Approved GM Events by Country**



# ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГМО ПО КОМБИНАЦИИ ВЫЯВЛЕННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

База данных ГМО «ГЕНБИТ»



база данных ГМО

ГМО-тест    Валидация    База данных ГМО    Контакты

Трансформационные события и генетические элементы генно-инженерно модифицированных культур

Показывать по 10 строк

Искать:  x

КУЛЬТУРА	СОБЫТИЕ	ПРОМОТОР	ТЕРМИНАТОР	МАРКЕР	СМЫСЛОВЫЙ	КОММЕНТАРИИ
Соя	A2704-12, A2704-21, A5547-35	p35S	t35S		pat	HT, RUS (A2704-12) / Bayer
Соя	A2704-12 x A5547-127	p35S	t35S		pat	HT / Bayer
Соя	A5547-127	p35S	t35S	bla	pat	HT, RUS / Bayer
Соя	FG72 x 5547-127	p-h4a748-ARATH, p35S	t35S, tNOS, t-H4-ARATH		2mepsps, hppd, pat	HT / Bayer
Соя	GU262	p35S	t35S	bla	pat	HT / Bayer
Соя	SYHT0H2	p35S, p-eSMP	tNOS		pat, avhppd-03	HT, RUS / Syngenta

Результаты 1 - 6 из 6 (Выбрано из 201 )

<< < 1 > >>

HT - устойчивость к гербицидам; IR - устойчивость к насекомым; IY - увеличенная продуктивность; MS - мужская стерильность; MUT - получено мутагенезом; PQ - изменённое качество продукта; PR - устойчивость к болезням и/или патогенам; VR - устойчивость к вирусам; RF - восстановленная фертильность; RUS - зарегистрировано в Российской Федерации (не для выращивания); STBS - пакетированное событие (стэк) полученное традиционными скрещиванием и селекцией;



Спасибо  
за  
внимание!

