

УДК 579.69

**ВЛИЯНИЕ ДНК ГЕННОМИДИФИЦИРОВАННЫХ СОИ GTS 40-3-2
И КУКУРУЗЫ MON810 НА ШТАММЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ
E. COLI O-55 И M-17**

Журба Р.Г.¹, Журба А.Г.², Симчук А.П.³

¹ГП «Крымстандартметрология», Симферополь, Украина

²7-я городская больница, Симферополь, Украина

³Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина

E-mail: ecology@crimea.edu

В данной работе освещены результаты исследования по влиянию ДНК некоторых линий ГМО на кишечную палочку *E. coli*. ПЦР анализ колоний, выращенных в присутствии генетически модифицированной ДНК, на наличие определенных последовательностей показал, что колонии одного из исследованных штаммов селективно накапливают некоторые искусственно встроенные участки.

Ключевые слова: генетически модифицированные растения, биоразнообразие.

ВВЕДЕНИЕ

В Картахенском протоколе по биобезопасности к конвенции о биологическом разнообразии говорится, что получение живых измененных организмов, их обработка, транспортировка, использование, передача и высвобождение должны осуществляться таким образом, чтобы не допускались или были уменьшены риски для биологического разнообразия, с учетом также рисков для здоровья человека [1]. Вопрос о ГМО в этом отношении до сих пор остается открытым. Нет существенных доказательств как в пользу вреда, так и в пользу безопасности искусственно созданных растений.

В МУ 2.3.2.2306-07 установлены требования к проведению оценки безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения (ГМО) (в Украине еще подобного документа не разработано) [2]. Одним из требований для регистрации ГМО является то, что информация о заявленных генно-инженерно-модифицированных организмах должна включать характеристику способности к переносу генов в другие организмы (растения, микроорганизмы) [3, 4].

Целью данной работы является исследовать влияние ДНК наиболее распространенных линий ГМО на колонии кишечной палочки, которые являются нормальными обитателями толстого кишечника как человека, так и других теплокровных животных [5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась с использованием штаммов кишечной палочки *E. coli* группы O-55 и M-17 и линий ГМО соя GTS 40-3-2 и кукуруза MON810.

Описание сои линии GTS 40-3-2. Линия сои GTS 40-3-2 была произведена компанией “Monsanto Canada Inc.”. Основным требованием при создании данной линии являлась устойчивость к действию гербицидов, используемых для борьбы с сорными растениями. Производство сои GTS 40-3-2 основано на технологии рекомбинантных ДНК посредством вставки глифосат-устойчивой формы гена, фермента 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). Глифосат-устойчивая форма гена EPSPS была выделена из штамма CP4 бактерии *Agrobacterium tumefaciens* и при помощи биолистического метода введена в геном линии сои A5403 [6].

Глифосат – это основной ингредиент гербицида Roundup, который широко используется во всем мире для борьбы с сорняками. Глифосат действует как конкурирующий ингибитор важнейшего фермента EPSPS, который вовлечен в биохимические пути синтеза таких ароматических аминокислот как фенилаланин, тирозин и триптофан. Ингибирование EPSPS приводит к подавлению роста растения и последующей гибели. Бактериальная же форма этого фермента нечувствительна к глифосату с одной стороны, а с другой – может быть использована при синтезе ароматических аминокислот в растениях. В сое GTS 40-3-2 находится под контролем сильного конститутивного промотора, выделенного из вируса мозаики цветной капусты (CaMV E35S) и терминатора нопалин-синтазы (T-nos), выделенного из *A. tumefaciens* [6].

Последовательность СТР4, выделенная из *Petunia hybrida*, расположенная слева от 5' конца гена CP4EPSPS, кодирует хлоропласт-транзитный пептид (Chloroplast Transit Peptide), при помощи которого вновь синтезированный фермент (EPSPS) импортируется в хлоропласты [8].

Стабильность интегрированного участка в растительном геноме. Литературные данные свидетельствуют о том, что линия GTS 40-3-2 содержит единственную функциональную экспрессионную кассету, содержащую промотор CaMV E35S, последовательность, кодирующую хлоропласт-транзитный пептид, последовательность, кодирующую CP4EPSPS и сигнал полиаденилирования nos (T-nos). Других составляющих плазмидного вектора, кроме экспрессионной кассеты, описанной выше, обнаружено не было. Последующие генерации описанной линии сои не обнаружили дальнейших сегрегаций встроенных генов, что свидетельствует о том, что линия GTS 40-3-2-гомозиготная по встроенному гену. Однако более подробная характеристика данной линии показала, что в ее геноме все же имеются 2 небольшие нефункциональные последовательности, свойственные плазмидному вектору PV-GMGTO4 размером 250 и 72 пары оснований [6].

Описание кукурузы MON810. Кукуруза линии MON810 произведена компанией «Monsanto Canada Inc.» MON810 обладает устойчивостью к насекомым вредителям, а в большей степени к *Ostrinia nubilalis*, что существенно снижает потери урожая кукурузы. Кроме того, при выращивании MON810 нет

необходимости обрабатывать посевы инсектицидами, что уменьшает экологический ущерб. Производство кукурузы MON810 обусловлены вставкой гена, кодирующего натуральный инсектицидный полипептид (ген выделен из *Bacillus thuringiensis* spp. *kurstaki*). Данный полипептид действует на некоторые виды чешуекрылых. Полипептид, экспрессирующийся в MON810, - это несколько урезанная форма инсектицидного полипептида, называемого CRYIA(b) d-эндотоксин, который собственно и обуславливает устойчивость к насекомым-вредителям [6].

B. thuringiensis – это спорообразующая, грамположительная, почвенная бактерия. Во время стадии спорогенеза бактерия продуцирует несколько видов инсектицидных полипептидов, в том числе CRYIA(b) d-эндотоксин. CRYIA(b) d-эндотоксин обладает высокой токсичностью для определенных видов насекомых и совершенно безопасен для человека и других позвоночных, трансформирован одной копией гена *cryIA(b)*, находящегося под контролем сильного конститутивного CaMV E35S промотора и лидирующей последовательности кукурузного интрона HSP70. Последовательность *cryIA(b)*, выделенная из *B. thuringiensis*, была модифицирована для увеличения уровня экспрессии CRYIA(b) d-эндотоксина в растительных тканях [6].

Действие CRYIA(b) d-эндотоксина обусловлено его связыванием со специфическими рецепторами, расположенными на мембранах эпителиальных клеток средней кишки насекомых. Вследствие этого, в эпителиальных клетках образуется пора, нарушается осмотический баланс, и клетки подвергаются лизису.

Исследования показали, что в геноме MON810 присутствует единственная копия гена *cryIA(b)*. Стабильность интегрированного участка показана при скрещивании с четырьмя линиями кукурузы [6].

Методика эксперимента. В течение 5 дней культуры кишечной палочки переседали на питательный агар. После посева на культуру вносили 50 мкл стандартного 1% р-ра ДНК сои GTS 40-3-2 и кукурузы MON810. После 5 пересевов культуры бактерий отбирали шпателем в отдельные полипропиленовые пробирки на 1,5 мл для последующего выделения ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-С».

Испытания на наличие последовательностей проводились тест-системами производства ЗАО «Синтол»: «Растение/35S/NOS скрининг», «Соя/GTS40-3-2 количество», «Кукуруза/MON810 количество» по стандартным методикам [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Испытание полученных образцов ДНК на наличие гена лектина (специфический ген сои) и гена зеина (специфический ген кукурузы), а также особых трансформационных событий для линий GTS 40-3-2 и MON810 дало отрицательный результат (табл. 1).

Из данной Таблицы видно, что в исследованных культурах штамма O-55 обнаруживаются последовательности p35S и tNOS (пробирки 5, 6, 11, 12). Последовательность, специфичная для ДНК растения обнаруживается на циклах,

значительно меньших, чем в контроле, что свидетельствует о том, что его концентрация в образце значительно снижена.

E. coli – нормальный обитатель толстого кишечника как человека, так и других теплокровных животных. Это – грамнегативная палочка, не образующая спор, подвижная (есть подвижные формы), факультативный анаэроб, растет на обычных питательных средах. На агаре дает крупные, выпуклые, блестящие колонии, мутные в проходящем свете. Не разжижает желатины, образует сероводород, часто и индол. Сбраживает до кислоты и газа лактозу и глюкозу. Восстанавливает нитраты в нитриты [5].

E. coli чаще всего является возбудителем заболеваний мочевых путей – пиелита, цистита. Она участвует также в смешанных заболеваниях стафилококкового и стрептококкового характера. У детей раннего возраста кишечная палочка может вызывать колисепсис и наконец, некоторые вирулентные, обладающие гемолитическими и некротическими свойствами штаммы – энтериты и гастроэнтериты. Стул при этом бывает водянистым, желтого цвета, с небольшой примесью слизи. Часто заболевания протекают по типу сепсиса или пневмонии.

Таблица 1.
Испытание полученных образцов ДНК на наличие последовательностей р35S и tNOS

Номер пробирки	Название	Наличие специфической последовательности растения	Наличие промотора р35S	Наличие терминатора tNOS
1.	ПКО-С1	+	+	+
2.	ПКО-С1	+	+	+
3.	ОКО	-	-	-
4.	ОКО	-	-	-
5.	MON810-O55	-	+	+
6.	MON810-O55	-	+	+
7.	MON810-M17	-	-	-
8.	MON810-M17	-	-	-
9.	GTS40-3-2-M17	-	-	-
10.	GTS40-3-2-M17	-	-	-
11.	GTS40-3-2-O55	-	+	+
12.	GTS40-3-2-O55	-	+	+
13.	M17-K	-	-	-
14.	M17-K	-	-	-
15.	O55-K	-	-	-
16.	O55-K	-	-	-

Примечание. ПКО-С1 – 1% стабилизированный контрольный образец сои GTS40-3-2, ОКО – отрицательный контроль амплификации на наличие контаминации.

При острых желудочно-кишечных заболеваниях у детей особенно часто выделяются культуры кишечной палочки, относящиеся к O-группам 55 и 111. При детских энтеритах был выделен также серологический тип O-26:B6. Описаны также заболевания, вызванные серотипами O-25, O-44, O-86, O-125, O-127 [8].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что культура штамма O-55 аккумулирует последовательности r35S и tNOS. Можно предположить, что эти последовательности встраиваются в ДНК бактерии и реплицируются вместе с ее ДНК. r35S является сильным промотором и может запускать транскрипцию участка ДНК, в который он встроится, что может вызывать синтез неспецифических белков. Изменение штамма может представлять риск как для здоровья человека, так и для биологического разнообразия видов, контактирующих с этим штаммом. Для оценки возможных последствий накопления генно-модифицированных участков представителями кишечной флоры необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, на основании полученных данных можно констатировать, что штамм *E. coli* группы O-55 аккумулирует последовательности r35S и tNOS, встроенные в ДНК сои линии GTS 40-3-2 и кукурузы MON810. С такой генетической нестабильностью и может быть связана способность этого штамма вызывать острые желудочно-кишечные заболевания у детей. В то же время, не обнаружено накопления в культуре бактерий штамма M-17 участков ДНК сои линии GTS 40-3-2 и кукурузы MON810.

ВЫВОД

Последствия аккумулирования r35S и tNOS бактериями кишечной палочки не определены. С этим может быть связан риск для биологического разнообразия и здоровья человека. Требуется более фундаментальные исследования по безопасности этих линий ГМО.

Список литературы

1. Картахенский протокол по биобезопасности к конвенции о биологическом разнообразии от 29 февраля 2000 г., статья 2, п. 2. М., «Роспотребстандарт», 2000. – С. 2.
2. МУ 2.3.2.2306-07 Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения, п. 1.1., М., «Роспотребстандарт», 2007. – С. 1.
3. МУ 2.3.2.2306-07 Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения, п. 2.1. М., «Роспотребстандарт», 2007. – С. 2.
4. МУ 2.3.2.1917-04 Пищевые продукты и пищевые добавки. Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически модифицированные аналоги., М., «Роспотребстандарт», 2004. – С. 1.
5. Ашмарин И.И. Практическая медицинская микробиология. (Руководство). 2-е изд. испр. и доп. Т. / И.И. Ашмарин – «Медицина», 1966. – С. 115.
6. Патрушев М.В. Генетически модифицированные источники: характеристика некоторых ГМ-линий, их детекция / М.В. Патрушев, М.В. Возняк // Партнеры и конкуренты. – 2004. – № 10. – С. 19–26
7. Ашмарин И.И. Практическая медицинская микробиология. (Руководство). 2-е изд. испр. и доп. Т. / И.И. Ашмарин– «Медицина», 1966. – С. 117.

Журба Р.Г. Вплив ДНК геномодифікованих сої GTS 40-3-2 та кукурудзи MON810 на штами кишкової палички *E. Coli* O-55 та M-17 / Р.Г. Журба, А.Г. Журба, А.П. Симчук // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 4. – С. 89-94.

В даній роботі відображені результати дослідження щодо впливу ДНК деяких ліній ГМО на кишкову паличку *E. coli*. ПЛР аналіз колоній, що були вирощені у присутності генетично модифікованої ДНК на присутність визначених послідовностей показав, що колонії одного з досліджених штамів селективно накопичують деякі штучно вбудовані фрагменти.

Ключові слова: генетично модифіковані рослини, біорізномаяття.

Zhurba R.G. Influence of the DNA from gene-modified GTS 40-3-2 soya and MON810 corn on the O-55 and M-17 *E. coli* stams / R.G. Zhurba, A.G. Zhurba, A.P. Simchuk // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No 4. – P. 89-94.

The work is focused on the investigation of the influence of DNA from some GMO lines on *E. coli*. PCR of colonies, that were grown with the presence of genetically modified DNA, has shown that colonies of one of the stamps selectively accumulate some of the artificially inserted DNA fragments.

Keywords: genetically modified plants, biodiversity.

Поступила в редакцію 17.11.2010 г.