

УДК 577.29

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ПЦР ДИАГНОСТИКИ НА НАЛИЧИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ДНК КУКУРУЗЫ

В.А. Шингирей,магистрант 2-го курса, напр. «Генетики», профиль спец. «Физиология,
зоология и генетика»**Г.Г. Гончаренко,**д.б.н., проф.,
ГГУ им. Ф. Скорины,
г. Гомель

Аннотация: В данном исследовании рассматривается функция 35S Cauliflower mosaic virus (CaMV 35S). Дана характеристика результатам качественного метода обнаружения промотора 35S методом ПЦР с гель-электрофорезом в ДНК зерновках кукурузы. Для анализа были взяты сорта ДКС 37-30, Жакари, Си Фортага, Новатоп. Используя данный метод выявлено, что в выращиваемой на территории Буда-Кошелевского района кукурузе (*Zea mays*) отсутствует промотор 35S. Из этого следует, что данные образцы кукурузы не являются генно-модифицированными организмами.

Ключевые слова: ПЦР-анализ, ДНК-праймеры, промотор, скрининг, ГМО

Качественные методы детекции ГМО основаны на распознавании конкретной трансгенной вставки, указывающей на наличие трансгенного события, осуществляемого в геноме исследуемого объекта. Такое событие называют «мишенью», которую выявляют при проведении ПЦР между ДНК растения и праймером.

Научные лаборатории выпускают готовые тест-системы для идентификации промоторов и/или терминаторов, но в тест-системах нет информации о нуклеотидной последовательности ДНК-праймеров, поэтому невозможно подтвердить чувствительность таких тест-систем [1]. Поэтому существует потребность в разработке

эффективных и недорогих праймеров для идентификации генов-мишеней и их регуляторных последовательностей во время ПЦР [1].

Целью исследования является качественный анализ кукурузы, вводимой в рацион сельскохозяйственным животным и конструирование ДНК-праймеров для идентификации регуляторных последовательностей в ГМ-растениях методом ПЦР-анализа с гель-электрофорезом.

Промотор – последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как начальная площадка для начала транскрипции. В генетической инженерии растений наиболее широко применяется конститутивный промотор 35S CaMV вируса мозаики цветной капусты Cauliflower mosaic virus (CaMV 35S).

Промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) используется в большинстве трансгенных культур для активации чужеродных генов, встроенных в растение. Промотор 35S обеспечивает транскрипцию в любых геномах растений: двудольных и однодольных, обеспечивает высокий уровень экспрессии гена, находящегося под его контролем и может работать при различных физиологических состояниях растения практически с одинаковой силой. Геном промотора 35S представлен двухцепочечной ДНК [2].

Скрининговый анализ – обнаружение наиболее распространенных промоторов и терминаторов. Позволяет найти ГМО в образце без идентификации чужеродной последовательности ДНК или регуляторных последовательностей. При анализе используются праймеры соответствующие последовательностям регуляторных промоторных элементов, наиболее часто используемых при конструировании ГМО (промоторы 35S CaMV, P-FMV, и др.) [3].

Поскольку метод основан на том, что последовательность чужеродной генетической конструкции известна заранее, в случае отрицательного результата может быть заявлено только об отсутствии известных чужеродных последовательностей в исследуемом образце. В случаях обнаружения неизвестных последовательностей наличие чужеродных генетических конструкций установить не удастся. Поэтому метод ПЦР лишь косвенно свидетельствует о наличии ГМО в исследуемом образце [3].

Схема анализа: подготовка проб сельскохозяйственной продукции (сухих семян кукурузы), подбор праймеров с помощью

онлайн-программы, выделение ДНК, амплификация выделенной ДНК, гель-электрофорез, контроль результатов идентификации промотора 35S. Методом выделения ДНК из сухих семян кукурузы послужил способ гомогенного выделения с помощью метод СТАВ [1]. Были учтены следующие параметры подбора праймеров: размер амплифицируемого продукта от 50 до 200 п.н., T_m 58-62 °С, длина праймера 20-30 п.н., GC состав ~40-60 %, праймеры не должны образовывать вторичных структур и димеров. Для 35S промотора вируса мозаики цветной капусты длина подобран прямой и обратный праймер [4]. Величина ампликона – 195 п.н. Длина праймеров составляет по 20 п.н и содержат 55 % GC нулеотидов (рис. 1):

PRF: TAGAGAGGCTTACGCAGCAG

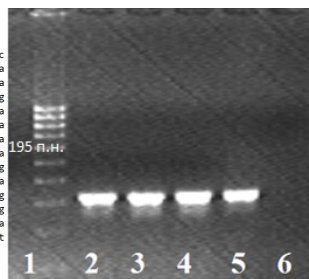
PRR: ATCTTTGGGACCACTGTCTGG

ORIGIN /note="Cauliflower mosaic virus 35S promoter"

```

1  agccttgcat gcttcaggat cccagatta gccttttcaa ttccagaagt atgtctaacc
61  cacagatggg tagagagact taccgcagc gtctctcaa gacgatctac ccgacaata
121 atctccagga aatacaatac ctctccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga
181 ctaactcatg caagaacaca gagaagata tatttttcaa gatcagaagt actattccag
241 tatggacgat tcaaggcttg ctccacaac caaggcaagt aatagagatt ggagtctcta
301 aaaaggtagt tcccaatgaa tcaaaaggca tggagtcaaa gattcaata gaggacctaa
361 cagaactcgc cgtaaaagact ggccaacagt tcatacagag tctcttacga ctcaatgaca
421 agaagaaaat cttgtcgaac atgtgtggagc acgacacact tgtctactcc aaaaatatca
481 aagatcagat ctccagagac caaagggcaa ttgagacttt tcaacaagg gtaatatcgc
541 gaaacctctc cggattccat tgccagata tctgtcaact tattgtgaag atagtggaaa
601 aggaagtggt cttctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gtggaagatg
661 cctctgcga cagtggttccc aagatggac cccaccacac caggagcattc gtggaagaa
721 aagagttcc aaccagctct tcaaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgagtaa
781 gggatgacgc acaatccac tatctctgc aagacccttc ctctatataa ggaagttaa
841 ttcatttggg gagaacacgg gggactctag aggatcc

```



а

б

Рисунок 1 – Промотора 35S:

- а) фрагмент промотора 35S с подобранными праймерами [5];
- б) электрофореграмма результата анализа растительного сырья на промотор 35S

Для повышения точности анализа использовались отрицательные контроли — холостой опыт и раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически немодифицированного источника растительного происхождения.

Отсутствие в анализируемой пробе ПЦР-продуктов размером 195 п.н. свидетельствует о том, что генетически модифицированных источников в анализируемом продукте нет. Следовательно промотор 35S отсутствуют в образцах кукурузы, предназначенной для употребления животными и человеком.

Список литературы

- [1] Макеева Е.Н. Современные технологии изучения геномной ДНК: учеб.- метод. пособие / Е.Н. Макеева, С.Е. Дромашко. – Минск: ИПНК, 2013. 66 с.
- [2] Генетические основы селекции растений / Институт генетики и цитологии. – Минск: Белорусская наука, 2014. Т. 4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия. 654 с.
- [3] Игнатъев И. Генетически модифицированные организмы и обеспечение биологической безопасности: учебное пособие / И. Игнатъев, И. Тромбицкий, А. Лозан. – Кишинев: Экоспектр-Бендеры, 2007. 60 с.
- [4] Молекулярная и прикладная генетика: науч. тр. Т. 4 / М75 ред.кол.: А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2006. 68 с.
- [5] NCBI: National Center for Biotechnology Information Search database. [Electronic resource]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M19099.1> (date of access: 21.09.2022).

© В.А. Шингирей, Г.Г. Гончаренко, 2022