

Подходы к регулированию ГМО и продукции, содержащей ГМ-компоненты

Дробот Н.И., Островская А.Н., Остапчик В.С., Мозгова Г.В.
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Drobat N. I., Astrouskaya A.N., Astapchik V.S., Mozgova G.V., Phd
The State Scientific Institution «Institute of Genetics and Cytology
of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Republic of Belarus

В настоящее время все больше возрастает промышленное использование генетически модифицированных организмов (ГМО) в ряде направлений хозяйственной деятельности и медицинской практике. Технология объединения генов разных организмов известна как технология рекомбинантных ДНК и полученный таким образом организм принято считать «генетически модифицированным» или «трансгенным». Под «трансгенными» или генетически модифицированными организмами (ГМО) подразумевают организмы, в геном которых были при помощи методов генной инженерии введены гены от филогенетически удаленных видов [5; 21].

Первое «генетически модифицированное растение» было произведено в 1983 г. и им стал устойчивый к антибиотикам табак. Китай стал первой страной, которая начала коммерциализацию модифицированного табака в начале 90-х годов. В 1994 г. в США Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов был одобрен к коммерческому использованию трансгенный помидор "Flavr Savr"[8,10]. По данным Международной службы по сбору агробιοтехнологических заявок (ISAAA) к 2019 году более 505 ГМ-линий растений прошли оценку рисков и официально одобрены для реализации в отдельных странах мира. Трансгенные растения производятся в промышленных масштабах в 22 странах мира на площадях более 114,3 млн. гектаров [1].

Технологии, используемые для создания ГМО.

Выделяют несколько подходов к созданию ГМО: прямые (биобаллистика, электропорация, микроинъекции, трансформация с использованием полиэтиленгликоля и силиконово-карбидных волокон и др.) и непрямые (перенос рекомбинантных ДНК с помощью вирусов, вирионов и агробактерий).

К методам прямого переноса относят методы, основанные на доставке и интеграции чужеродных генов в пролиферирующие и способные к регенерации протопласты [22]. Первые трансгенные растения кукурузы и ячменя были получены путем обработки суспензии протопластов полиэтиленгликолем. Эффективность данного метода является не очень высокой и в отдельных случаях достигала только 10%, кроме того было выявлено, что при культивировании протопластов с высокой вероятностью возникают соматональные варианты [2]. Более эффективным методом является электропорация, в ходе которой культуру протопластов смешивают с раствором целевой ДНК и подвергают воздействию короткого

электрического импульса [20]. Одним из прямых методов переноса чужеродной ДНК также является технология микроинъекций, при которой встраиваемая ДНК вводится с помощью специальной микропипетки прямо в ядро зародышевой клетки [20]. Наиболее широко применяемым методом прямой трансформации стала биобаллистическая трансформация (бомбардировка микрочастицами). Технология включает в себя осаждение ДНК на частицах инертного металла (золото, вольфрам, платина) и «обстреливание» растительной ткани этими частицами из специальной генной пушки. Основное преимущество данного метода заключается в том, что он позволяет трансформировать экспланты однодольных растений, которые не могут быть трансформированы другими методами [20]. К недостаткам такой технологии относят возможность вставки участков не более 10 т.п.н., также часто сниженную продуктивность полученных трансформантов [2].

Одним из наиболее часто применимых методов непрямого переноса рекомбинантной ДНК в растительные клетки является агробактериальная трансформация. Данный метод осуществляется при помощи грамотрицательных почвенных бактерий рода *Agrobacterium* (*Agrobacterium tumefaciens* или *A. rhizogenes*) [24]. Технология агробактериальной трансформации характеризуется высокой вероятностью интеграции гетерологичного гена, возможностью работы с достаточно длинными (до 150 kb) фрагментами ДНК [2].

В настоящее время благодаря серии фундаментальных открытий в молекулярной биологии появилось несколько высокотехнологичных подходов для редактирования геномов: включение, удаление или перемещение отдельных нуклеотидов и фрагментов ДНК при помощи специально сконструированных биомолекул (эндонуклеаз), которые можно направлять в определенные сайты в пределах генома целевого организма, чтобы повлиять на конкретные изменения в последовательности ДНК. Было показано, что методика редактирования генома с помощью специально сконструированных искусственных нуклеаз является достаточно эффективной и надежной. В настоящий момент сконструировано и тщательно изучено достаточно большое количество мегануклеаз, таких как «цинковые пальцы» (англ. zinc finger nucleases или ZFNs), нуклеазы, активирующее транскрипцию (англ. transcriptional activator-like effector nucleases или TALENs) и эндонуклеаза Cas9, ассоциированная с короткими палиндромными повторами

(CRISPR/Cas9). Необходимо отметить, что относительная простота использования системы CRISPR/Cas9, привела к быстрому распространению и использованию этого метода в качестве предпочтительного при создании высокоспецифических изменений в геномах растений [26].

Подходы к регулированию рынка ГМО. Если рассматривать глобальный рынок ГМО в целом, то можно выделить ряд основных тенденций в сфере регулирования. Большинство стран мира придерживаются принципа предосторожности к регулированию ГМО. Из 197 стран мира 173 подписали Картахенский протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии, включая Республику Беларусь [12]. В соответствии с принципом принятия мер предосторожности, содержащимся в Принципе 15 Рио-де-Жанейрской декларации по окружающей среде и развитию, цель Картахенского Протокола заключается в содействии обеспечению надлежащего уровня защиты в области безопасной передачи, обработки и использования живых измененных организмов (синоним ГМО), являющихся результатом применения современной биотехнологии и способных оказать неблагоприятное воздействие на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом также рисков для здоровья человека и с уделением особого внимания трансграничному перемещению. Страны-участницы данного протокола обеспечивают необходимый уровень безопасности при перемещении, обработке грузов и применении ГМО, которые потенциально могут оказать негативное влияние на биоразнообразие. В Протоколе также определены основополагающие принципы оценки рисков живых измененных организмов и необходимость проведения такой оценки. Законодательство стран-участниц Картахенского протокола в отношении ГМО строится с учетом принятого международного обязательства и в обязательном порядке размещается на веб-сайте Механизма посредничества к Картахенскому протоколу по биобезопасности [25] для того, чтобы другие страны, планирующие перемещать ГМО для высвобождения на поля либо для использования в хозяйственной деятельности знали и соблюдали законы стран импорта. Так, в Республике Беларусь 9 января 2006 г. принят «Закон о безопасности генно-инженерной деятельности» № 96-З (в ред. от 18.12.2018 N 154-З), который вместе с разработанными к нему нормативно-правовыми актами, регулирует деятельность, связанную с созданием генно-инженерных организмов, осуществлением работ с генно-инженерными организмами в замкнутых системах, высвобождением их в окружающую среду для проведения испытаний, использованием в хозяйственных целях, ввозом в Республику Беларусь, вывозом из Республики Беларусь, транзитом через ее территорию генно-инженерных организмов, их транспортировкой, хранением и обезвреживанием [3]. Следует отметить, что в нормативно-правовых документах стран, не являющихся участниками Картахенского протокола по биобезопасности, например Российской Федерации, США, Канады и ряда других, также закреплены принципы безопасного использования ГМО, включая необходимость проведения оценки потенциальных рисков ГМО для

окружающей среды и здоровья человека, либо оценки рисков продуктов питания, кормов и сырья, полученных из ГМО, разработаны методические подходы к оценке и регулированию рисков [25]. Необходимо добавить, что международная организация Codex Alimentarius, образованная Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) совместно с Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (ФАО), также способствует гармонизации международных стандартов в отношении ГМО: проводит оценку потенциальных рисков биотехнологий и осуществляет поиск решений для их минимизации, разрабатывает методы идентификации ГМО в продукции, занимается вопросами стандартизации продовольствия и мониторингом качества продукции [13].

В Республике Беларусь в соответствии со статьёй №5 закона № 90-З «О защите прав потребителей», реализуется право потребителя на получение достоверной информации о пищевых продуктах, в том числе о содержании в них ГМО или их компонентов [4]. В связи с этим, было разработано Постановление Министров «О некоторых вопросах информирования потребителей о продовольственном сырье и пищевых продуктах» № 434 от 28 апреля 2005 г [6], которое регламентирует наличие обязательной маркировки при наличии ГМО в продовольственном сырье или продуктах на каждой единице потребительской тары. При этом согласно данному постановлению, производство и продажа детского питания, изготовленного с использованием генетически модифицированных составляющих, запрещается [6].

Маркировка. Маркировка продукции, содержащей ГМО является важным моментом для отслеживания оборота продукции, содержащей ГМО. Маркировка может быть обязательной и закрепленной на законодательном уровне, а также добровольной. Порог содержания ГМО, после которого продукция маркируется, также различается в ряде стран [18]. Добровольная маркировка практикуется в США, Аргентине, Канаде и странах Южной Африки [19]. В документе Европейского Союза «A strategy for Europe – life science and biotechnology» Еврокомиссия выступает за введение обязательной маркировки с 2002 года, пересмотр действующего законодательства с целью усиления юридической защиты внутреннего рынка продовольствия [16]. С апреля 2004 года в соответствии с Регламентом (ЕС) №1829/2003 от 22 сентября 2003 года вся продукция, с содержанием ГМ-компонентов, превышающим 0,9% каждого ингредиента от общего состава ингредиентов продукта, подлежит обязательной маркировке [16, 17].

В Республике Беларусь в соответствии со статьёй №5 закона № 90-З «О защите прав потребителей», реализуется право потребителя на получение достоверной информации о пищевых продуктах, в том числе о содержании в них ГМО или их компонентов [4]. Постановление Совета Министров «О некоторых вопросах информирования потребителей о продовольственном сырье и пищевых продуктах» № 434 от 28 апреля 2005 г. регламентирует наличие обязательной маркировки при наличии ГМО в продовольственном сырье или продуктах на каждой единице

потребительской тары [6]. При этом, согласно данному постановлению, производство и продажа детского питания, изготовленного с использованием генетически модифицированных составляющих, запрещается [6].

Методические подходы детекции ГМО. В настоящее время существует достаточно большое количество методов обнаружения ГМО в продуктах питания, пищевых добавках и кормах. Благодаря своим многочисленным преимуществам метод количественной ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR) является основным методом рутинной лабораторной диагностики. Однако, существуют также альтернативные технологии детекции ГМО, такие как петлевая изотермическая амплификация (LAMP), цифровая ПЦР (digital PCR), технология микрочипов и технология Luminex [15].

Система qRT-PCR позволяет идентифицировать и количественно определять ГМО с помощью интеркалирующего красителя SYBR Green или технологии TaqMan (с использованием флуоресцентного зонда). Данный метод подходит для идентификации ГМО как в необработанном сырье, так и в готовых продуктах питания и кормах. Поиск разрешенных и неразрешенных (не прошедших оценку безопасности) ГМО выполняется в несколько этапов. Первоначально проводится скрининг, который включает идентификацию наиболее распространенных трансгенных элементов, например промотора CaMV 35S, FMV 35S, терминаторов tNos, E9, последовательностей SSuAra, cp4epsps, pat, bar, cry3A, cry3B; в схему скрининга могут включать, в зависимости от анализируемого вида организма, более редко встречаемые ГМ-последовательности Cry3Bb, t35S, pCAMBIA и др [9; 11; 23]. Такой подход позволяет составить список потенциальных ГМО, присутствующих в исследуемых образцах и разработать стратегию дальнейшей

идентификации отдельных трансгенных линий. Второй этап анализа включают в себя точную идентификацию ГМ-линий в образце и их количественную оценку [9; 11; 23].

Для увеличения эффективности реакции ПЦР, а также определения абсолютного количественного содержания ГМ-события в исследуемых образцах, особенно когда количество копий такого события низкое и /или присутствуют ингибиторы ПЦР возможно применение технологии цифровой капельной ПЦР (англ., droplet digital PCR). Данная технология может стать ключевым инструментом в области детекции ГМО, поскольку обеспечивает абсолютную, а не относительную, как в qRT-PCR, оценку содержания ГМ-события. Данный метод не требует использования стандартных образцов, более того, благодаря разделению образца на множество капель на эффективность ПЦР-реакции оказывают меньшее влияние ингибиторы, что позволяет снизить неопределенность измерения, особенно при низком числе копий [15].

Однако следует отметить, что в связи с увеличением количества разрешенных ГМО и потенциальным присутствием неразрешенных ГМО на рынке стран необходимо постоянно разрабатывать и использовать дополнительные ДНК-маркеры, и усложнять схемы скрининга для того, чтобы выявить все разрешенные и неразрешенные ГМ-линии [9]. Для точного подтверждения количественного содержания ГМО необходима разработка методов мультиплекс-ПЦР для одновременного прохождения нескольких реакций детекции ГМ-компонентов в одной пробирке, что позволит снизить стоимость данного метода и одновременно увеличит скорость выполнения работ.

Литература:

1. База данных сертификатов GM | База данных ГМО | Сертификаты GM на сельскохозяйственные культуры - ISAAA.org [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>.
2. Данилова С. А. Методы Генетической Трансформации Зерновых Культур // Физиология Растений. 2007. № 5 (54).
3. Закон РБ О безопасности генно-инженерной деятельности [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://kodeksy-by.com/zakon_rb_o_bezopasnosti_genno-inzhenernoj_deyatelnosti.htm.
4. Закон Республики Беларусь № 90-З (Закон Республики Беларусь от 9 января 2002 г. №90-З «О защите прав потребителей.») [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://etalonline.by/document/?regnum=N10200090>.
5. Матвеева Т.В. Не совсем трансгенные растения / Т.В. Матвеева // Материалы международной конференции. – Вестник защиты растений, 2016. – Т. 3(89). – С. 106-108.
6. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pravo.by/document/?guid=3871&p0=C20500434>.
7. Об утверждении перечня продовольственного сырья и пищевых продуктов, подлежащих [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://pravo.levonevsky.org/bazaby/org273/basic/text0014.htm>.
8. Чемерис А. В. [и др.]. Надо Ли Опасаться Гмо?взгляд Несторонних Наблюдателей На Истерию Вокруг // Биомика. 2014. № 2 (6)
9. Angers-Loustau A. [и др.]. JRC GMO-Matrix: a web application to support Genetically Modified Organisms detection strategies // BMC Bioinformatics. 2014. № 1 (15). С. 417.
10. Bawa A.S. Genetically modified foods: safety, risks and public concerns—a review / A.S. Bawa, K.R. Anilakumar // Journal of Food Science and Technology. – 2013. – Vol. 50. – Genetically modified foods. – № 6. – P. 1035-1046.
11. Broeders S. Development of a Molecular Platform for GMO Detection in Food and Feed on the Basis of “Combinatory qPCR” Technology / S. Broeders, N. Papazova // Polymerase Chain Reaction. – P. 44.

12. Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes. Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity. – Montreal: SCBD, 2000. – 30 p.
13. Codex Alimentarius [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>.
14. Commissioner O. of the. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act) [Электронный ресурс] / O. of the Commissioner. – Режим доступа: <https://www.fda.gov/regulatory-information/laws-enforced-fda/federal-food-drug-and-cosmetic-act-fdc-act>.
15. Current and New Approaches in GMO Detection: Challenges and Solutions [Электронный ресурс]: Review Article / M.-A. Fraiture [et al.] DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/392872>. – Режим доступа: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/392872/>.
16. Life sciences and biotechnology - a strategy for Europe: communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the Economic and Social Committee and the Committee of the Regions : COM (2002) 27. Life sciences and biotechnology - a strategy for Europe / ed. European Commission. – Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002. – 46 p.
17. Moschini G. Biotechnology and the development of food markets: retrospect and prospects / G. Moschini // European Review of Agricultural Economics. – 2008. – Vol. 35, № 3. – P. 331-355.
18. New technologies and food labelling: the controversy over labelling of foods derived from genetically modified crops. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fao.org/3/i0576e/i0576e10.pdf> (дата обращения: 30.09.2020).
19. Nutrition C. for F.S. and A. Guidance for Industry: Voluntary Labeling Indicating Whether Foods Have or Have Not Been Derived from Genetically Engineered Plants [Электронный ресурс] / C. for F.S. and A. Nutrition. – Режим доступа: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-voluntary-labeling-indicating-whether-foods-have-or-have-not-been-derived>.
20. Sharma K. K., Bhatnagar-Mathur P., Thorpe T. A. Genetic Transformation Technology: Status and Problems // In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. 2005. № 2 (41). С. 102-112.
21. Schouten H.J. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis / H.J. Schouten, F.A. Krens, E. Jacobsen // EMBO Reports. – 2006. – Т. 7. – Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. – № 8. – С. 750-753.
22. Sood P. Problems and possibilities of monocot transformation / P. Sood, A. Bhattacharya, A. Sood // Biologia Plantarum. – 2011. – Vol. 55. – № 1. – P. 1-15.
23. SYBR@Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products / E. Barbau-Piednoir [et al.] // Eur. Food Res. Technol. – 2010. – Vol. 230. – № 3. – P. 383-393.
24. The transfer of DNA from Agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights / J. Zupan [et al.] // The Plant Journal. – 2000. – Vol. 23. – The transfer of DNA from Agrobacterium tumefaciens into plants. – № 1. – P. 11-28.
25. Unit B. Biosafety Clearing-House // The Biosafety Clearing-House (BCH) [Электронный ресурс]. URL: <http://bch.cbd.int/> (дата обращения: 30.09.2020).
26. Zhao H. Risk associated with off-target plant genome editing and methods for its limitation / H. Zhao, J.D. Wolt // Emerging Topics in Life Sciences. – 2017. – Vol. 1. – № 2. – P. 231-240.