

## ИНФОРМАЦИЯ

об оценке риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов, относящихся к высшим растениям (голосеменным и покрытосеменным) – трансгенной формы рапса с геном куриного альфа-интерферона – на здоровье человека и окружающую среду, а также о мерах по предупреждению такого риска

### 1. Информация о биологических особенностях реципиентного организма

#### 1.1. Полное название:

Отдел – *Magnoliophyta*

Класс – *Dicotyledones*

Порядок – *Capparales*

Семейство – *Brassicaceae*

Род – *Brassica*

Вид – *Napus*

Сорт – Прамень

Рапс (*Brassica napus* L.var.*napus*) – однолетнее растение семейства крестоцветные (капустные) с геномом ААСС (2n=38). Возник от естественного скрещивания примерно в 1680 г. капусты листовой (*B.oleracea*, 2n=18, геном СС) и сурепицы (*B. campestris*, 2n=20, геном АА) с последующим удвоением хромосом. Рапс существует в виде двух морфологически не отличимых форм: яровой (*B. napus annua* Metzger) и озимой (*B. napus biennis* Metzger). В таблице 1 приведена характеристика ярового рапса.

Таблица 1 – Морфологические признаки ярового рапса

Признак	Характеристика признака
1	2
Корень	Конусовидный, с хорошо развитой системой боковых корней, глубиной 2 м и более
Стебель	Один стебель высотой от 80 до 150 см
Соцветие	Многоцветковая, рыхлая кисть, отцветающая снизу вверх
Форма листьев	Нижние листья лировидно-перистонадрезанные, черешковые, верхние – удлинненно-ланцетовидные с расширенным основанием
1	2

Тип розетки	Приподнятая над поверхностью почвы
Семядольные листья	Симметричные
Розеточные листья	Ярко-зеленые или с восковым налетом
Цветки	Ярко-желтые среднего размера
Длительность цветения	Одного цветка – 2–3 дня, всего растения – 12–35 дней
Стручки	Гладкие или слабобугорчатые, длиной 5–10 см, с тонким небольшим носиком
Масса 1000 семян, г	2,8–4,8
Окраска и форма семян	Черная, темно-бурая, округлая или шаровидная, с одним рубчиком

Сорт Прамень характеризуется как среднеспелый гибрид с урожайностью 27,1 ц/га. Семена содержат 40,9% масла, 0,83% эруковой кислоты и менее 1,0% глюкозинолатов. Сорт Прамень отличается высокой масличностью (47,2%), устойчивостью к болезням и осыпанию. Из-за низкого содержания эруковой кислоты и глюкозинолатов относится к пищевым сортам типа «канола». Сорт адаптирован к климатическим условиям Беларуси и отличается высокой продуктивностью; районирован по всем областям Республики и широко используются в получении маслосемян и белкового шрота.

### 1.2. Информация, касающаяся особенностей размножения

Рапс является факультативным самоопылителем. С помощью насекомых-опылителей у ярового рапса происходит от 3 до 5% опыления, а у озимого - до 30%. Основную роль в опылении играют такие насекомые-опылители как пчелы (*Apis mellifera*) и шмели (*Bombus sp.*). Размножение рапса в природе происходит семенами, которые могут сохранять всхожесть в течение 5-6 лет. Для получения семян яровой рапс выращивают с апреля по август, озимый - с августа по июль следующего года.

### 1.3. Выживаемость в окружающей среде

Размножение рапса в природе происходит семенами, их всхожесть может сохраняться в течение 5-6 лет. Семена обычно хранятся в специальных хранилищах при плюсовой температуре. На выживаемость оказывает влияние температура и степень поражения фитопатогенами.

### 1.4. Рассеивание

Рассеивание рапса естественным путём возможно вследствие опадания семян до сбора урожая. Для предотвращения перекрёстного опыления между сортами рапса необходимо соблюдение пространственной изоляции между различными сортами. Рапс также скрещивается с капустой, сурепицей, горчицей чёрной и сарептской и другими видами рода *Brassica*.

### *1.5. Географическое распространение*

Возделывается рапс с 16 века в Англии. С 1836 года известен на Западной Украине. Рапс *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC. Возделывается более чем в 50 странах мира, основные посевные площади сосредоточены в Китае, Канаде, Индии, Германии, Франции. Мировой сбор семян этой культуры в 2013 году составил более 62,5 млн. тонн (FAO), по количеству производимого растительного масла рапсу принадлежит третье место в мире после сои и хлопчатника.

### *1.6. Описание мест естественного произрастания, включая информацию о естественных хищниках, паразитах, конкурентах и симбионтах*

Рапс – это однолетнее светолюбивое растение длинного дня, требовательное к влаге и плодородию почвы. Растения рапса цветут и плодоносят при 12-14 часовом дне, при укорочении светового дня вегетативная масса увеличивается, а семенная продуктивность снижается. Территории возделывания – умеренные широты Северного полушария. Температурный диапазон прорастания семян ярового рапса: минимальная температура, при которой семена ярового рапса могут прорасти – 1–3 °С, оптимальная – 14–17 °С. Рапс растет на многих видах почв: черноземах, серых лесных, на супесях, суглинках и жирных глинах. Наиболее пригодными являются дерново-подзолистые почвы с содержанием гумуса не менее 1,5 %, имеющие рН – 6,5-7,5. В Республике Беларусь условия для произрастания рапса вполне благоприятны. Одной из важных проблем культивирования рапса, как и многих других сельскохозяйственных культур, является зарастание его сорняками. В условиях Республики Беларусь наибольшую опасность для растений рапса представляют такие заболевания как черная пятнистость, или альтернариоз, серая и белая гнили, а также фомоз.

### *1.7. Потенциально значимое взаимодействие с организмами, отличными от растений, в экосистемах, характерных для обычного произрастания, включая информацию о токсичности для людей, животных или других организмов*

Потенциально значимое взаимодействие с организмами, отличными от растений, в экосистемах, характерных для обычного произрастания, отсутствует.

Рапс является третьей по значимости масличной культурой в мире. Продукты, жмых и шрот, получаемые из семян рапса после экстракции масла, используются как богатый белком корм для животных в натуральном виде и для приготовления комбикормов. Растения рапса широко используются также в виде зеленой массы для скармливания всем видам сельскохозяйственных животных, семена рапса добавляют в корм сельскохозяйственной птицы.

При создании растений-биофабрик для производства ценных биологически-активных веществ, предпочтительными являются высокопродуктивные семенные культуры. Рапс (*Brassica napus*) относится к таким культурам. Кроме того, большой практический интерес представляет получение съедобных препаратов в виде семян, жмыха и шрота растений рапса, содержащих куриный интерферон. Создание систем экспрессии ценных биологически активных белков в клетках рапса считается перспективным даже с учётом таких факторов, как возможность перекрёстного опыления, а также неравномерность созревания семян, приводящая к засорению площадей для выращивания [1]. В настоящее время посевы биотехнологически-модифицированных сортов рапса по всему миру занимают около 6 мегагектаров [2].

Более полная информация о биологических особенностях рапса как реципиентного организма представлена в Консенсусном документе OECD по биологии масличного рапса *Brassica napus* L.

## 2. Информация о биологических особенностях организмов донора

### 2.1. Полное название:

Царство: Животные

Тип: Хордовые

Класс: Птицы

Подкласс: Новонёбные

Отряд: Курообразные (Galliformes)

Семейство: Фазановые (Phasianidae)

Подсемейство: Фазаны (Phasianinae)

Род: Гребенчатые куры (*Gallus*)

Вид: Банкивская джунглевая курица

Группа: Домашняя курица

Латинское название *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758)

### 2.2. Происхождение организма донора

Домашние куры произошли от диких банкивских кур (*Gallus gallus*), обитающих в Азии. Дикие представители рода населяют территорию Индии, Индокитая, Южного Китая, Индонезии и Филиппин.

### 2.3. Биологические характеристики организма донора

Домашняя курица (*Gallus gallus domesticus*) – самый многочисленный и распространённый вид домашней птицы [3]. Отличается высокой яйценоскостью и скороспелостью. За длительную историю одомашнивания человеком выведено большое количество разнообразных пород кур, которые делятся на мясные, мясояичные и яичные. Вес кур различных пород составляет примерно от 0,5 до 5 кг. Мужские особи – петухи обычно тяжелее самок: разница в весе может составлять до 1 кг. Петухи отличаются ярким оперением, особенно на длинном пышном хвосте и шее, а также костными выростами на лапах – шпорами. И курица, и петух имеют на

голове бородку и гребень, которые являются органами терморегуляции и позволяют перенаправлять кровотоки к коже. В большинстве случаев гребень у петуха больше, чем у курицы. Клюв у кур слегка изогнутый, цвет оперения зависит от породы. Куры питаются мелкими семенами, травами и листьями, червями, мелкими насекомыми. В зависимости от породы и условий содержания одна курица-несушка может нести до 10 лет и давать за год от 90 до 300 яиц, но в хозяйствах их держат не более 2-3 лет.

Курица – наиболее распространённый среди птиц лабораторный объект, один из основных модельных организмов в классической и современной генетике. Кариотип включает 78 хромосом ( $2n$ ). Депонированные нуклеотидные последовательности в базе данных *Entrez Nucleotide*, GenBank, NCBI, США: 884453 (по состоянию на 15 февраля 2015). Депонированные последовательности белков в базе данных *Entrez Protein*, GenBank, NCBI, США: 53250 (по состоянию на 15 февраля 2015). Геном: 1,25 пг (C-value). ДНК домашней курицы использована при создании молекулярно-генетических карт, микросателлитных и других генетических маркеров, геномных БАК-библиотек и для полного секвенирования вида *Gallus gallus*. Геном *G. gallus* служит «эталонным» (англ. *reference genome*) для сравнения с другими геномами, в частности, в сравнительной геномике для выяснения эволюции птичьих геномов и позвоночных животных в целом. Куриный геном также включён в ряд общих и специализированных геномных браузеров.

### 3. Биологические особенности вектора

#### 3.1. Природа и происхождение вектора, естественная среда обитания и соответствующие характеристики безопасности

Векторные системы для генетической трансформации рапса получены на основе Ti-плазмиды грамотрицательной почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, существующей в ризосфере растений. T-область почвенной бактерии способна встраиваться в геном растений и содержит онкогены, вызывающие корончатые галлы у двудольных растений. Бинарные векторные системы, используемые для агробактериальной трансформации, не содержат онкогенов и каких-либо других последовательностей природной T-области, кроме концевых повторов, необходимых для переноса последовательности, находящейся между ними. Векторные системы состоят из бинарного вектора, несущего в T-области маркерные и целевые гены, а также плазмиды-помощника, несущей гены вирулентности для встраивания T-области в геном растения. Агробактериальная векторная система для генетической трансформации растений не обладает функциями для естественного встраивания T-ДНК в геном организмов, отличных от растений. Наличие клеток агробактериальных штаммов в тканях трансгенных линий, используемых для выпуска в окружающую среду, исключено.

#### 3.2. Структура транспозонов, промоторов и других некодирующих генетических сегментов, использованных для создания генетической

*конструкции, необходимых для ее переноса и функционирования в реципиентном организме*

Генетические конструкции получены на основе бинарного вектора pB7WG2 [4]. Данная плазмида является вектором для доставки T-ДНК, входящим в систему клонирования "GATEWAY" (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA). Клонирование по технологии "GATEWAY" основано на системе сайт-специфической рекомбинации фага  $\lambda$ : фрагменты ДНК между сайтами рекомбинации (*att*) могут быть перенесены в векторы, содержащие совместимые сайты рекомбинации ( $attB \times attP$  or  $attL \times attR$ ) с помощью реакции, опосредованной клонезами "GATEWAY BP Clonase" или "LR Clonase Enzyme Mix" (Invitrogen). Основой вектора является плазмида pPZP200 [5]. Данная плазмида размером 6,7 тпн содержит сайты для репликации как в клетках *E. coli* (ColE1), так и в *Agrobacterium* (pVS1); *bon* сайт плазмиды pBR322 для мобилизации из *E. coli* в клетки агробактерий, а также гены устойчивости к стрептомицину и спектиномицину для селекции в клетках бактерий. T-область плазмиды pB7WG2 (переносимый в геном растений фрагмент вектора) ограничена повторами из T<sub>i</sub>-плазмиды нопаинового типа pTiT37 и содержит маркерный ген фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазы *Streptomyces. hygrosopicus* (*bar*), определяющий устойчивость клеток растений к фифинотрицину (гербицидам Биалафос, Баста). Данный маркерный ген включает промотор и терминатор нопаинсинтетазы [6] и расположен у левой границы T-области.

Кассета для экспрессии в клетках растений вектора pB7WG2, расположенная у правой границы T-области, содержит промотор и терминатор вируса мозаики цветной капусты CaMV35S [7], а также лидерную последовательность вируса мозаики табака (TMV) [8] и сайты рекомбинации "GATEWAY" для встраивания целевых последовательностей под контроль промотора. Кассета обеспечивает конститутивную экспрессию клонированной последовательности во всех тканях растения.

*3.3. Частота мобилизации (способность приобретения мобильности) встроенного вектора или переноса в другие организмы):*

Цельный вектор не встраивается в хромосомную ДНК. Встроенная в геном растений T-ДНК вектора свойствами мобильности или переноса в другие организмы не обладает. Перенос T-ДНК из генома трансгенного рапса в другие растения возможен только в процессе переопыления (см п. 1.4). Вероятность горизонтального переноса T-ДНК в геномы других организмов, отличных от высших растений, ничтожно мала. Кроме того, искусственные гены содержат растительные регуляторные генетические элементы (промоторы и терминаторы транскрипции) и не могут экспрессироваться в клетках млекопитающих и человека с использованием вышеуказанных сигналов транскрипции.

*3.4. Факторы, которые могут влиять на способность вектора адаптироваться в других организмах-хозяевах*

T-область бинарного вектора заключается во встраивании исключительно в геном растений. Организмом-хозяином вектора являются клетки агробактерий искусственно созданных агробактериальных штаммов, в которых вектор наиболее активен. Возможен искусственный (с участием человека в условиях лаборатории) перенос агробактериальной векторной системы в другие отличные от агробактерий бактериальные штаммы со значительным снижением активности вектора.

#### 4. Информация, относящаяся к характеру генно-инженерной модификации

##### 4.1. Методы, использованные при создании, переносе трансгенной конструкции и отборе трансгенных организмов

Плазмида pUC18, показанная на рисунке 1, служила исходной плазмидой для клонирования гена куриного интерферона.

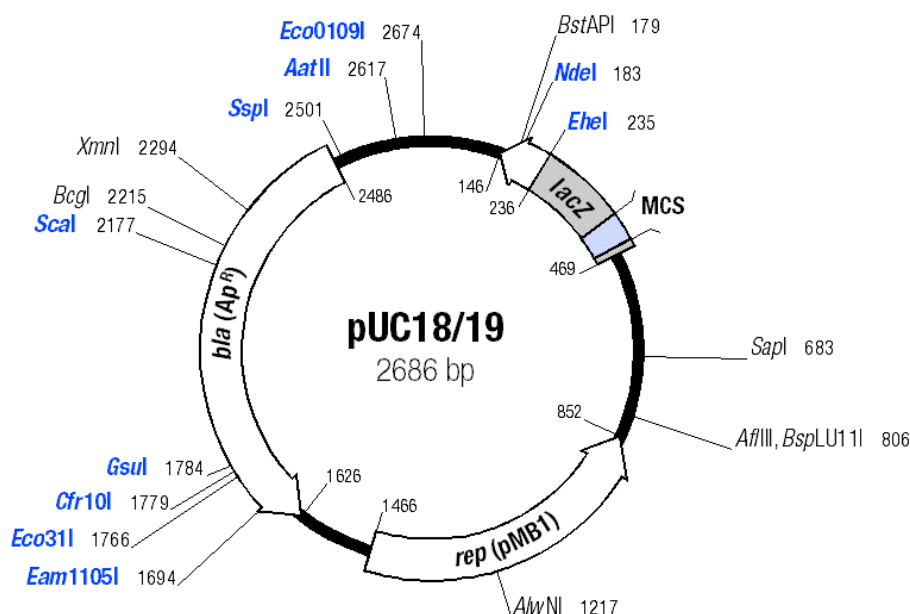


Рисунок 1 – Схематическое изображение плазмид pUC18/19:

Плазмиды включают:

rMB1 – репликон *rep* ответственный за репликацию плазмиды (источник - плазида pBR322), высокое число копий pUC-плазмид результат отсутствия *gor* гена и точковая мутация в гер pMB1,

*bla* – ген, кодирующий β-лактамизу, что обеспечивает устойчивость к ампицилину (источник – плазида pBR322),

участок *lac*-оперона *E.coli*, содержащий CAP-сайт, промотор *Plac*, *lac*-репрессор связывающий сайт и 5'-терминальную часть *lacZ*-гена, кодирующего N-терминальный фрагмент β-галактозидазы (источник – M13mp18/19)

У кур-доноров было отобрано 20 мл крови, из которой после стабилизации раствором ЭДТА (0,5 моль/л), была выделена тотальная ДНК.

Выделенная ДНК была использована в качестве матрицы для амплификации гена альфа-интерферона с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), для чего на основе имеющихся в базе данных GenBank последовательностей куриного альфа-интерферона (коды доступа U07868, X92476, X92477, X92478) сконструировали праймеры: F1 ggccatattgtgcaaccaccttcgccccca, (подчеркнут сайт для рестриктазы NdeI), R1 gcggaattcttaaagcttagtgcgcgtgtgcctg (подчеркнуты сайты для рестриктаз EcoRI и HindIII)/

В составе сайта для NdeI содержится иницирующий кодон ATG (САТАТГ), а между сайтами для рестриктаз EcoRI (GAATTC) и HindIII (AAGCTT) – терминирующий кодон.

Полученные фрагменты ДНК обрабатывали рестриктазами NdeI и EcoRI и встраивали в вектор pUC18. Проведенное секвенирование показало, что нуклеотидная последовательность амплифицированного фрагмента полностью соответствует последовательности гена куриного лейкоцитарного альфа-интерферона из базы данных (рисунок 2).

tgc aac cac ctt cgc ccc cag gat gcc acc ttc tet cac gac agc ctc cag ctc ctc cgg gac atg gct  
ccc aca cta ccc cag ctg tgc cca cag cac aac gcg tet tgc tcc ttc aac gac acc atc ctg gac acc agc aac  
acc cgg caa gcc gac aaa acc acc cac gac atc ctt cag cac ctc ttc aaa atc ctc agc agc ccc agc act cca  
gcc cac tgg aac gac agc caa cgc caa agc ctc ctc aac cgg atc cac cgc tac acc cag cac ctc gag caa tgc  
ttg gac agc agc gac acg cgc tcc cgg acg cga tgg cct cgc aac ctt cac ctc acc atc aaa aaa cac ttc agc  
tgc ctc cac acc ttc ctc caa gac aac gat tac agc gcc tgc gcc tgg gaa cac gtc cgc ctg caa gct cgt gcc  
tgg ttc ctg cac atc cac aac ctc aca ggc aac acg cgc act tag

Рисунок 2 – Нуклеотидная последовательность структурной части гена куриного лейкоцитарного альфа-интерферона (код доступа U07868).

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал, что белок куриного альфа-интерферона имеет низкую степень гомологии (около 24 – 28 %) с альфа-интерфероном человека как показано на рисунке 3: идентичных аминокислот – 26/107 (24%); сходных аминокислот – 53/107 (49%).

**Chick-IFN-альфа 316 HDILQHLFKILSSPSTPAHWNDSQRQSLNRIHRYTQHLEQLDSSDTRSRTWPR-NLH 492**

Н+++Q +F + S+ + A W+++ +++ LE C+ +T ++  
 Hu-IFN-альфа 58 HEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQQNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSI 117

**Chick-IFN-альфа 493 LTIKKHFSLHTFLQDNDYSACAWEHVRLQARAWFLHIHNLGTNTRT 633**

L ++K+F + +L++ YS CAWE VR + F NL + R+  
 Hu-IFN-альфа 118 LAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRS 164

Рисунок 3 – Гомология аминокислотных последовательностей альфа-интерферона курицы домашней (*Gallus gallus*) (код доступа AAA50213), человека разумного (*Homo sapiens*) (код доступа NP\_000596).



Для клонирования и создания экспрессионных конструкций использовали метод “Gateway Cloning Technology” ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)), который имеет ряд преимуществ перед классическими методами. “Gateway Technology” основывается на сайт-специфичной рекомбинационной способности фага лямбда. Встраивание гена происходит посредством реакции обмена/рекомбинации через определенные ДНК последовательности, называемые сайтами рекомбинации (attL, attR, attB, и attP) катализируемые специфическими ферментами – клонзамами (Clonase LR или BP Clonase) (рисунок 4). Преимущество Gateway Cloning Technology в том, что гены, клонированные в pENTR векторах, затем могут быть переклонированы параллельно в один или несколько экспрессионных векторов различного типа посредством простой, 60-минутной реакции. Кроме того, высокий процент (> 95 %) полученных колоний содержат экспрессионные клоны с желаемой/правильной ориентацией клонируемого фрагмента и рамками считывания.

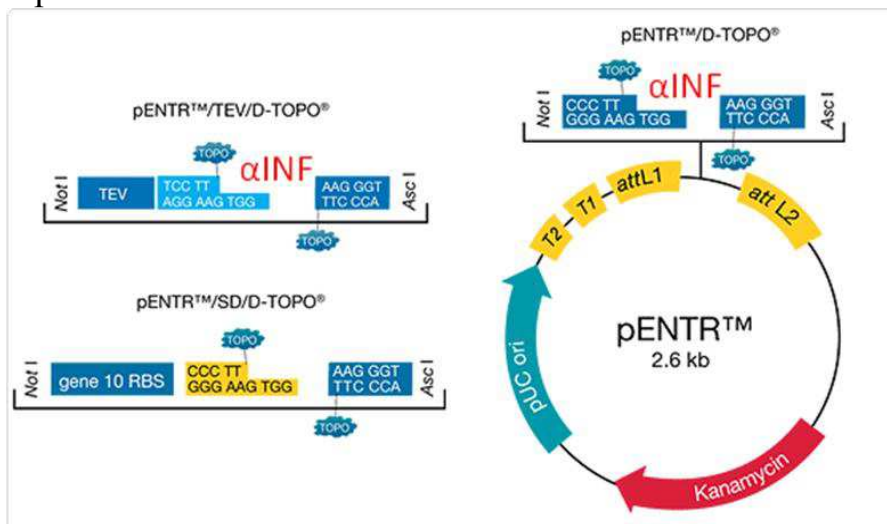


Рисунок 4 – Схематическое представление полученных pENTR клонов несущих ген куриного альфа-интерферона (invitrogen.com)

В качестве исходного вектора использован бинарный вектор pB7WG2 [4] (см п. 3.2). На основе геномной последовательности *Gallus gallus* разработаны олиго нуклеотидные праймеры для амплификации гена куриного интерферона. В праймеры для амплификации введена последовательность САСС необходимая для клонирования в промежуточный вектор pENTR-D/Торо. Амплифицированный фрагмент ДНК встраивался в вектор в результате реакции топоизомеризации. Наличие искомой вставки в рекомбинантной плазмиде было подтверждено рестрикционным анализом, а также секвенированием последовательности гена. Полученная плазида была введена в клетки бактерии *E.coli* штамма DH10В.

Далее из промежуточного вектора ген интерферона был встроен в экспрессионный бинарный вектор pB7WG2 в результате реакции рекомбинации с использованием фермента “LR clonase II” (Invitrogen) с введением полученного бинарного вектора в клетки штамма *E. coli* DH5альфа.

Таким образом, сконструированный агробактериальный вектор (рисунок 5) содержит экспрессионную кассету, состоящую из: конститутивного промотора вируса мозаики цветной капусты (35S), целевой ген куриного альфа интерферона и ген *bar*, обуславливающий устойчивость к гербициду баста (аналог РРТ- фосфинотрицин), находящийся под промотором нопаинсинтазы (Pnos).

## A

```
GTGGGCGCCGGCGGTCGAGTGGCGACGGCGCGGCTTGTCCGCGCCCTGGTAGATTGCCTGGCCGTAGGCCAGCCA
TTTTGAGCGGCCAGCGGCCGCGATAGGCCGACGCGAAGCGGGCGGGCGTAGGGAGCGCAGCGACCGAAGGGTA
GGCGCTTTTTGCAGCTCTTCGGCTGTGCGCTGGCCAGACAGTTATGCACAGGCCAGGCGGGTTTTAAGAGTTTTAA
TAAGTTTTAAAGAGTTTTAGGCGGAAAAATCGCCTTTTTCTCTTTTATATCAGTCACTTACATGTGTGACCGGTT
CCAATGTACGGCTTTGGGTCCCAATGTACGGGTCCGGTCCCAATGTACGGCTTTGGGTCCCAATGTACGTGCT
ATCCACAGGAAAGAGACCTTTTCGACCTTTTTCCCCTGCTAGGGCAATTTGCCCTAGCATCTGCTCCGATATTAGG
AACCGGCGGATGCTTCGCCCTCGATCAGGTTGCGGTAGCGCATGACTAGGATCGGGCCAGCCTGCCCGCCTCCTC
CTTCAAATCGTACTCCGGCAGGTCATTTGACCCGATCAGCTTGCACAGGTGAAACAGAACTTCTTGAACCTCCTCG
GCGTGCCTACTGCGTTCTGATAGTCGTTGAACAACCATCTGGCTTCTGCCTTGCCTGCGGCGCGGCGTGCCAGGC
GGTAGAGAAAACGGCCGATGCCGGGATCGATCAAAAAAGTAATCGGGGTGAACCGTCAGCACGTCCGGGTTCTTGC
CTTCTGTGATCTCGCGTACATCCAATCAGTACGTCGATCTCGATGTAATCAGTACTCCGGCCCGCCGTTTTCGCTTTTACG
ATCTTGTAGCTGCTAATCAAGGTTTACCCTCGGATACCGTCAACAGGCGGCGCTTGGCCCTTCTGCTACGCTG
CATGGCAACGTGCGTGGTGTAAACCGAATGCAGGTTTCTACCAGGTCGCTTTCTGCTTTCCGCCATCGGCTCGCC
GGCAGAACTTGAGTACGTCCGCAACGTGTGGACGGAACACGCGGCCGGGCTTGTCTCCCTTCCCTTCCCGGTATCG
GTTTATGGATTTCGGTTAGATGGGAAACCGCCATCAGTACCAGGTCGTAATCCACACACTGGCCATGCCGGCCGGC
CCTGCGGAAACCTTACGTGCCCGTCTGGAAGCTCGTAGCGGATCACCTCGCCAGCTCGTCCGGTACAGCTTCGACA
GACGGAACCGCCACGTCCATGATGCTGCGACTATCGCGGGTGCCACGTCATAGAGCATCGGAACGAAAAAAT
CTGGTTGCTCGTCCCTTGGGCGGCTTCCATAATCGACGGCGCACCGGCTGCCGGCGGTTGCCGGGATCTTTGCG
GATTCGATCAGCGGCTTGCACGATTCACCCAGGTCATACCCAGCGCCGCGGATTTGTACCGGGCCGATGGTTTGC
GCGCCCTTCAACCTTCCACCGATCACCCAGCGCCGCGGATTTGTACCGGGCCGATGGTTTGCAGCCGT
CACGCCGATTCCTCGGGCTTGGGGGTTCCAGTGCCATTGCAGGGCCGGCAGACAACCCAGCCGTTACGCCTGGCC
AACCGCCGTTCTCCACACATGGGGCATTCCACGGCGTCCGTTGCCTGGTTGTTCTTGTATTTCCATGCCGCTCCT
TTAGCCGTAATAATTCATCTACTCATTTATTCATTTGCTCATTTACTCTGGTAGCTGCGCGATGTATTACAGATAGCA
GCTCGGTAATGGTCTTGCCTTGGCGTACCAGGTCATCTTACGCTTGGTGTGATCCTCCGCCGGCAACTGAAAGTT
GACCCGCTTATGGCTGGCGTGTCTGCCAGGCTGGCAACGTTGCAGCCTTGTGCTGCGTGCCTCGGACGGCCG
GCACTTAGCGTGTTTGTGCTTTTGTCTTTTACCTCATTAACTCAAATGAGTTTTGATTTAATTTACAGCGG
CCAGCGCCTGGACCTCGCGGGCAGCGTCCGCCCTCGGGTTCTGATTCAAGAACGGTTGTGCCGGCGCGGCGCATGC
CTGGGTAGCTCACGCGTGCCTGATACGGGACTCAAGAATGGGCAGCTCGTACCCGGCCAGCGCCTCGGCAACCT
CACCGCCGATGCGCGTGCCTTTGATCGCCCGGACACGACAAGGCCGCTTGTAGCCTTCCATCCGTGACCTCAAT
GCGTGTCTTAACCAGCTCCACCAGGTCGGCGGTGGCCCATATGTCGTAAGGGCTTGGCTGCACCCGGAATCAGCAC
GAAGTCGGCTGCCTTGTATCGCGGACACAGCCAAAGTCCGCCGCTGGGGCGCTCCGTCGATCACTACGAAGTCGCG
CCGGCCGATGGCCTTACGTGCGGGTCAATCGTCCGGCGGTGATGCCGACAACGGTTAGCGGTTGATCTTCCCGC
ACGGCCGCCAATCGCGGGACTGCGCTGGGGTTCGAAATCGACTAACAGAACATCGGCCCGGCGAGTTGCAGG
GCGGGCTAGATGGGTTGCGATGGTCTGCTTGCCTGCAACCGCCTTCTGGTTAAGTAAAGTACAGCATAACCTTACG
GTTCCCTTGGCTATTTGTTATTTACTCATCGCATCATATACGACGACCGCATGACGCAAGCTGTTTTACTCAA
ATACACATCACCTTTTTAGACGGCGGCGCTCGGTTTCTTACGCGGCAAGCTGGCCGGCCAGGCGGCCAGCTTGGC
ATCAGACAAACCGCCAGGATTTATGACAGCCGACGGTTGAGACGTGCGCGGGCGGCTCGAACACGTACCCGGC
CGGATCATCTCCGCCCTCGATCTCTCGGTAATGAAAAACGGTTGCTCCTGGCCGCTCGGTGCGGTTTTCATGCTT
TTCTTGGCGTTTCTTCCGGCGGCCAGGGCGTCCGCTCGGTCATGCGTCTTACGGAAGGCACCGCGC
CGCTGGCCTCGGTGGGCGTCACTTCTCGCTGCGTCAAGTGCAGCGGTACAGGTCGAGCGATGCACGCCAAGC
AGTGCAGCGCCTTTTACGGTGCAGCCTTCTGGTTCGATCAGCTCGCGGGCGTGCAGGATCTGTGCGGGGTTGA
GGTAGGGCGGGGCAAACTTACGCCTCGGGCCTTGGCGGCTCGCGCCCGCTCCGGGTGCGGTGCGATGATTA
GGGAACGCTCGAACTCGGCAATGCCGGCAACACGGTCAACACCATGCCGGCCGGCCGGCGTGGTGGTGTGCGCCC
ACGGCTTGCAGGCTACGCAGGCCCGCGCCGGCCTCCTGGATGCGCTCGGCAATGTCCAGTAGGTCGCGGGTGT
GCGGGCCAGGCGGTAGCCTGGTCACTGTCAACGTCGCCAGGGCGTAGGTTGTTCAAGCATCCTGGCCAGCTC
CGGGCGGTGCGCCTGGTGCAGGTTGATCTTCTCGGAAAAACAGCTTGGTGCAGCCGGCCGCTGCAGTTCCGGCCCGT
TGTTGGTCAAGTCTGGTGTGCTGCGGTGCTGACGCGGCAATGACCCAGCAGGCGCGGCGGCTTGTTCATGG
CGTAATGTCTCCGTTCTAGTTCGCAAGTATTCTACTTTATGCGATAAAAACACGCGACAAGAAACCTGAGAAA
AGGGCAGGGCGGCGAGCCTGTCCGTAACCTTAGGACTTGTGCGACATGTCGTTTTTCAAGAAGACGGGTGCACTGAAC
GTCAGAAGCCGACTGCACTATAGCAGCGGAGGGGTTGGATCAAAGTAC TTTGATCCCGAGGGGAACCCTGTGGT
GGCATGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTTACGCCCCTTTTAAATATCCGTTATTCTAATAAACGCTC
TTTTCTTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCT
GATCCAAGCTCAAGCTAAGCTTGAGCTCTCCCATATGGTTCGACTAGAGCCAAGCTGATCTCCTTTGCCCGGAGAT
CACCATGGACGACTTTCTTATCTTACGATCTAGGAAGAAAGTTCGACGGAGAGGTTGACGATACCATGTTCCAC
ACCGATAATGAGAAGATTAGCCTTTCAATTTAGAAAGAAATGCTGACCCACAGATGGTTAGAGAGGCTACGCG
GCAGGTTCTCAAGACGATCTACCCGAGTAAATAATCTCCAGGAGATCAAATACCTTCCCAAGAAGGTTAAAGAT
GCAGTCAAAAGATTACAGGACTAAGTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTTCTCAAGATCAGAAGTACTATT
```



## Б

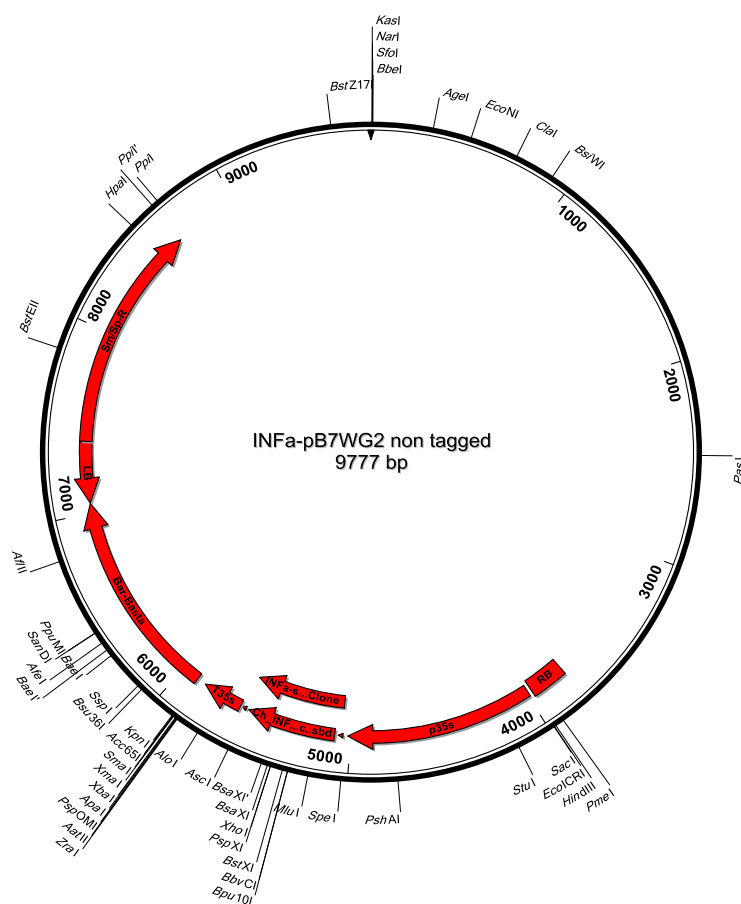


Рисунок 5. – Полная последовательность ДНК (А), рестрикционная и генетическая карта (Б) сконструированного бинарного вектора для агробактериальной трансформации растений – INFa-pB7WG2 с целевым геном куриного альфа-интерферона (INFa) и маркерным геном устойчивости к фосфинотрицину/гербициду Баста *bar* (Bar-Basta).

А. Цветом выделены: промотор вируса мозаики цветной капусты, кодирующая последовательность гена куриного интерферона, ген устойчивости к гербициду Баста, левая граница T-области, правая граница T-области.

Б. p35S, T35S – промотор, терминатор вируса мозаики цветной капусты соответственно; LB, RB – левая, правая граница T-области соответственно.

Сконструированный вектор вводили при помощи электропорации в клетки штамма *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Агробактериальную трансформацию растений рапса проводили методом *in planta*. Для трансформации использовался сорт рапса белорусской селекции Прамень. Семена сорта Прамень получены из лаборатории рапса Республиканского

Унитарного Предприятия «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

Трансформация проводилась по протоколу *Supartana et al.* [9] и *Kojima et al.* [10] с модификациями. Семена рапса поверхностно стерилизовали 2 мин в 75% этаноле и 10 мин в 10% растворе хлорамина. Трижды отмывали дистиллированной водой и проращивали в термостате при 26°C. После проращивания растения выращивали при 22°C с фотопериодом 16/8 (свет/темнота) в световой комнате 3-4 дня до достижения длины проростка 1,5-2 см. Проросткам лезвием наносилось поранение между семядолями через апикальную меристему на 1,5-2 мм до семядольного узла – небольшого утолщения под семядольными листьями, состоящего из меристемной ткани, отвечающей за развитие всех последующих надземных органов растения (рисунок 6).

Пораненный проросток опускали на 30-40 секунд в агробактериальную суспензию, содержащую 3% сахарозы, 0,2% Твин-80, 8 мг/л ацетосирингона. После этого растения промокали на фильтровальной бумаге и высаживали в искусственную почву для укоренения (Рис. 6В). Контролем служили пораненные тем же методом и обработанные тем же раствором (3% сахарозы, 0,2% Твин-80, 8 мг/л ацетосирингона) проростки, но без обработки агробактериями.

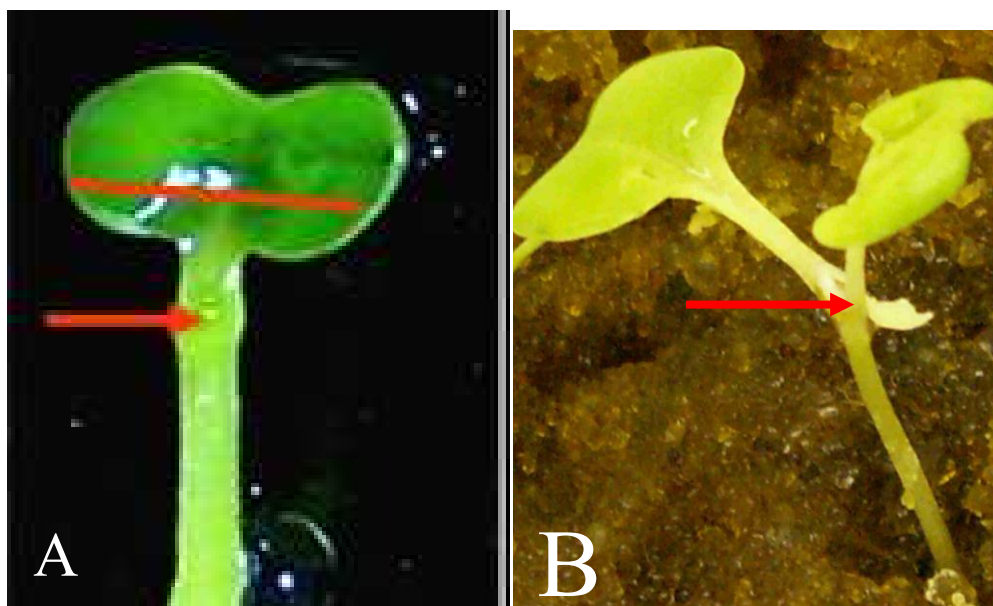


Рисунок 6 – Нанесение пореза лезвием проросткам рапса перед проведением инокуляции агробактериями.

А. Семядольный узел на проростке рапса. Одна семядоля удалена.

В. Проросток после поранения. Красная стрелка указывает на семядольный узел.

Отбор трансформированных растений проводили примерно через 10-15 дней после пересадки на стадии развития 3-4 листьев. Для селекции

использовался гербицид Баста. Проводилась трехкратная обработка коммерческим препаратом (разведение 1:1000) из пульвезизатора с интервалом в 10 дней.

4.2. описание встроенного в геном (плазмон) реципиентного организма фрагмента ДНК (размер и источник, то есть название донорного организма(ов) и предполагаемая функция каждого составного элемента или района встроенной ДНК, включая регуляторные и другие элементы, влияющие на функционирование трансгенов), структура (сиквенс) и функциональное соответствие встроенного фрагмента ДНК, присутствие в нем известных потенциально опасных последовательностей;

Цель генетической модификации – включение в геном растений рапса и экспрессия в нем гена, определяющего синтез белка куриного альфа-интерферона. Кроме того в геном генетически модифицированных растений вводится маркерный ген *bar Streptomyces. hygrosopicus*, обуславливающий устойчивость растений к гербициду Баста – трансгенный признак необходимый для отбора ГМО. Активным компонентом гербицида Баста является глюфосинат аммония (фосфинотрицин аммония) [11].

Использованная для генетической трансформации растений рапса INF $\alpha$ -pB7WG2 содержит кДНК гена куриного интерферона. В результате секвенирования установлена полная нуклеотидная последовательность гена куриного интерферона (рисунок 7).

```
tgcaaccaccttcgccccaggatgccaccttctctcacgacagcctccagctcctccgg
C N H L R P Q D A T F S H D S L Q L L R
gacatggctcccacactaccccagctgtgcccacagcacaacgcgtcttgctccttcaac
D M A P T L P Q L C P Q H N A S C S F N
gacaccatcctggacaccagcaaacccccggcaagccgacaaaaaccacccacgacatcctt
D T I L D T S N T R Q A D K T T H D I L
cagcacctcttcaaaatcctcagcagccccagcactccagcccactggaacgacagccaa
Q H L F K I L S S P S T P A H W N D S Q
cgcsaaagcctcctcaaccggatccaccgctacaccagcacctcgagcaatgcttggac
R Q A S C L N R I H R Y T Q H L E Q C L D
agcagcgcacgcgctcccggacgcgatggcctcgcaaccttcacctcaccatcaaaaaa
S S D T R S R T R W P R N L H L T I K K
cacttcagctgcctccacaccttcccaagacaacgattacagcgcctgcgctgggaa
H F S C L H T F L Q D N D Y S A C A W E
cacgtccgcctgcaagctcgtgcctggttcctgcacatccacaacctcacaggcaacacg
H V R L Q A R A W F L H I H N L T G N T
cgcaacttag
R T -
```

Рисунок 7 – Последовательность гена куриного альфа интерферона.

Заявляемая трансгенная линия рапса содержит, по сравнению с исходным сортом, вставки чужеродной ДНК, представляющие собой генетический материал следующих организмов: *Gallus gallus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, вируса мозаики цветной капусты (таблица 2). Все перечисленные организмы не являются опасными для здоровья человека (по классификации ВОЗ).

Таблица 2 – Генетические элементы, входящие в состав трансгенных вставок у линий рапса с генами куриного альфа интерферона и *bar*

№п/п	Генетический элемент	Происхождение	Функция
1	2	3	4
1	кДНК куриного альфа-интерферона Ch_INFα	Геном курицы домашней <i>Gallus gallus</i>	Кодирует первичную структуру белка куриного альфа-интерферона
2	Ген фосфинотрицинацетилтрансферазы <i>bar</i>	Геном бактерия <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Маркерный ген для селективного отбора трансформированных растений с использованием гербицидов Баста, Биалафос
3	35S-промотор вируса мозаики цветной капусты PCaMV35S	Геном вируса мозаики цветной капусты	Обеспечивает конститутивную экспрессию целевого гена
4	Промотор гена нопалин-синтетазы Pnos	Ti-плазида <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Обеспечивает конститутивную экспрессию маркерного гена
5	Терминальная последовательность <i>polyA</i> гена нопалин-синтетазы Tnos	Ti-плазида <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Обеспечивает завершение транскрипции целевого и маркерного генов
6	Лидерная последовательность вируса мозаики табака	Геном вируса табачной мозаики (Tobacco mosaic virus)	Нетранслируемая последовательность, увеличивающая экспрессию гена (энхансер)
7	Правая граница T-области RB	T-область плазмиды pTiT37 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Встраивание ДНК в геном растений
8	Левая граница T-области RL	T-область плазмиды pTiT37 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Встраивание ДНК в геном растений



В заявляемой трансгенной линии рапса использована система экспрессии целевого гена куриного альфа-интерферона *Gallus gallus* с конститутивным промотором 35S вируса мозаики цветной капусты и терминальной последовательностью гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*. 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) является одним из наиболее часто используемых для обеспечения экспрессии встраиваемых генов в двудольных растениях. Это конститутивный промотор, ведущий к наработке существенных количеств белка экспрессируемого гена [12].

Генетическая карта вектора, использованного при получении заявляемой трансгенной линии рапса, представлена в разделе 4. В разделе 4.2 на рисунке 2 представлена нуклеотидная последовательность целевого гена. Таким образом, созданная и встроенная в геном растений рапса генетическая конструкция содержит элементы, выделенные из ДНК организмов, которые не относятся к категории опасных для здоровья человека. По структуре и функциям они соответствуют своему назначению. В интегрированных в геном растений фрагментах ДНК отсутствуют потенциально опасные последовательности.

*4.3. Наличие во встроенной ДНК каких-либо неизвестных последовательностей и информация о том, в какой степени вставка ограничена ДНК, необходимой для осуществления предполагаемой функции*

Во встроенной ДНК каких-либо неизвестных последовательностей не выявлено. Вставки ДНК содержат только последовательности, содержащиеся в переносимой генетической конструкции, описанные в разделах 3 и 4.

*4.4. Характеристика сайта модификации реципиентного генома (плазмона), локализация вставки (инкорпорирована в хромосому, хлоропласты, митохондрии или находится в неинтегрированном состоянии)*

Использование метода агробактериальной трансформации предполагает инкорпорацию вставки в хромосомы реципиентного растения. Инкорпорация в хромосомы заявляемой линии подтверждена с использованием метода ПЦР (наличие последовательностей целевого гена и маркерного гена в геноме трансформированных растений рапса поколений T0 и T1).

*4.5. Стабильность инкорпорации привнесенной ДНК в геном (плазмон) реципиентного организма*

Проведен первичный анализ трансгенных растений поколений T0 и T1. Стабильность инкорпорации привнесенной ДНК в геном реципиентного организма будет выявлена в дальнейшей работе.

*4.6. Количество копий трансгенов*

Количество копий трансгенов будет выявлено в дальнейшей работе.



4.7. Описание методики обнаружения и идентификации встроенного фрагмента ДНК, чувствительность, надежность и специфичность этой методики.

Обнаружение и идентификация встроенного фрагмента ДНК проводится методом ПЦР. Метод ПЦР характеризуется 100% специфичностью (отсутствие перекрестных реакций с неспецифическими ДНК при концентрации до  $1 \times 10^6$  геномных эквивалентов /мл) и высокой чувствительностью (не менее  $1 \times 10^4$  геномных эквивалентов/мл). С использованием специфических праймеров выявляется наличие конкретной последовательности нуклеиновой кислоты.

Используется метод ДНК-ПЦР с праймерами специфичными к кодирующим последовательностям гена куриного альфа-интерферона и маркерного гена *bar* (таблицы 3 и 4). Праймеры также могут быть применены для идентификации методом “гнездовой ПЦР” что существенно повышает чувствительность и специфичность, особенно для слабых ПЦР-сигналов.

Таблица 3 – Олигонуклеотидные праймеры для детекции гена куриного альфа-интерферона методом ПЦР

Наименование праймера	Нуклеотидная последовательность	Позиция ампликона в последовательности гена
Ch_I1S	5'– ctcaaaatcctcagcagcc	184-401
Ch_I1A	5'– cgctgtaatcggtgtcttg	
Ch-IF4S	5'– atgccacctctctcagac	23-463
Ch-IF4A	5'– gaggttgatgtgcagga	
Ch-IF3S	5'– aacgacaccatcctggacac	160-458
Ch-IF3A	5'– aggcgctgtaatcggtgtct	

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержит буфер с 25 мМ ионов  $Mg^{2+}$ , 1 ед. “*LC-Taq-polymerase*”, по 10 мкМ каждого из четырех дНТП, специфические олигонуклеотидные праймеры (6-10 пмоль), а также 50-100 нг ДНК-матрицы или количество кДНК-матрицы, соответствующее 50 нг тотальной РНК.

Используется следующая программа для термоциклера (скорость набора температуры при отжиге праймеров 1 °С/сек):

95 °С – 5 мин	}	35-40 циклов
94 °С – 30 сек		
57 °С – 30 сек		
72 °С – 30 сек		
72 °С – 7 мин		

Таблица 4 – Олигонуклеотидные праймеры для детекции гена устойчивости к фосфинотрицину *bar* методом ПЦР

Наименование праймера	Нуклеотидная последовательность	Позиция праймера в последовательности гена <i>bar</i> (от начала последовательности праймера Bar1S)
Bar1S	5'-t ctgcaccatcgtcaaccactaca'	1-24
Bar1A	5'- gcagcccgatgacagcgaccac'	324-303
Bar2S	5'- ctacatcgagacaagcacggt'	20-40
Bar2A	5'- cacgctcttgaagccctgt'	305-287
Bar3S	5'- tcaacttccgtaccgagcc	40-58
Bar3A	5'- cgtccagtcgtaggcgttg	197-179

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержит буфер с 25 мМ ионов  $Mg^{2+}$ , 1 ед. “*LC-Taq-polymerase*”, по 10 мкМ каждого из четырех дНТП, специфические олигонуклеотидные праймеры (6-10 пмоль), а также 50-100 нг ДНК-матрицы или количество кДНК-матрицы, соответствующее 50 нг тотальной РНК.

Используется следующая программа для термоциклера (скорость набора температуры при отжиге праймеров 1 °С/сек):

95 °С – 5 мин	} 35-40 циклов
94 °С – 30 сек	
62 °С (для Bar 1) и 57 °С (для Bar2 и Bar3) – 30 сек	
72 °С – 45 сек	
72 °С – 7 мин	

После ПЦР проводится горизонтальный электрофорез продуктов амплификации в агарозном геле с добавлением красителя SYBR Green I. Результаты разделения визуализируются при освещении гелей ультрафиолетовым светом с помощью трансиллюминатора или прибора для гель-документирования ( $\lambda_{детекции}=520$  нм). Размеры определяются путем сравнения с маркерными линейными фрагментами ДНК Чувствительность метода: определение наличия трансгенной вставки в 100 нг суммарной растительной ДНК.

### 5. Информация, относящаяся к биологическим особенностям генно-инженерных организмов

5.1. Описание генетических признаков или фенотипических характеристик, которые стали проявляться или перестали проявляться у ГИО по сравнению с реципиентным организмом

В генетическом отношении заявляемая трансгенная линия отличается от реципиентного организма по наличию в геноме 2-х рекомбинантных

генов: куриного альфа-интерферона, который кодирует соответствующий белок, и *bar*, который кодирует фермент фосфинотрицинацетилтрансферазу. В результате в растительном организме синтезируется белок куриного альфа-интерферона, который обладает антивирусной, иммуномодулирующей и антипролиферативными активностями. Кроме того, в клетках растений синтезируется бактериальный фермент с высокой каталитической активностью, участвующий в инактивации гербицидов, содержащих модифицированный фосфинотрицин, таких как Баста и Биалафос, что обуславливает устойчивость трансгенных растений рапса к данным гербицидам.

Каких-либо морфологических видоизменений у трансгенной линии не наблюдается.

### *5.2. Генетическая стабильность ГИО*

Наличие трансгена в хромосомной ДНК и его экспрессия показаны для трансформированных растений рапса поколений T0 и T1. Генетическая стабильность трансгенной вставки у заявляемой трансгенной линии будет выявлена в ходе анализа последующих поколений.

### *5.3. Степень и уровень экспрессии трансгена(ов). Метод оценки экспрессии трансгена, его чувствительность*

Наличие экспрессии трансгенов определяется методом кДНК--ПЦР: для целевого и маркерного генов с праймерами, перечисленными в таблицах 3 и 4 (п. 4.7) Тотальная РНК выделяется с использованием реагента "TRIreagent" (Сигма) по протоколу фирмы-производителя. Препараты кДНК готовятся с использованием AMV-обратной транскриптазы и олиго dT<sub>18</sub> праймера. Среднее количество кДНК в пробе для ПЦР соответствует 25-50 нг суммарной растительной РНК..

Уровень экспрессии трансгенов будет определён в дальнейшей работе.

### *5.4. Активность и свойства протеинов, кодируемых трансгенами*

Целевым трансгеном заявляемой линии является кДНК куриного альфа-интерферона. Куриный альфа-интерферон является полипептидом с молекулярной массой около 20 кДа. Характеризуется высокой удельной антивирусной активностью –  $1,8 \times 10^8$  МЕ/мг белка. Проявляет антивирусную, иммуномодулирующую и антипролиферативную активности при взаимодействии с специфическими клеточными рецепторами. Эффективен в борьбе с такими вирусными инфекциями, как вирус птичьего гриппа (AIV), вирус псевдочумы птиц (NDV), вирус инфекционного бурсита (IBDV), вирус инфекционного бронхита птиц (IBV), вирус болезни Марека (MDV) и вирус саркомы Рауса (RSV). Относится к классу цитокинов – гормоноподобных регуляторных «защитных» белков. Кислотоустойчив и термостабилен.

Активность куриного альфа-интерферона, синтезируемого в клетках заявляемой трансгенной линии рапса, не определялась.

Маркерный ген *bar* содержит кДНК гена *S. hygrosopicus*, детерминирующего устойчивость к биалафосу. Биалафос (L-фосфинотрицил-

L-аланил-L-аланин) [13]. 4. Production of phosphonic acid derivatives, 2-hydroxyethylphosphonic acid, hydroxymethylphosphonic acid and phosphonoformic acid by blocked mutants of *Streptomyces hygrosopicus* SF-1293 and their roles in the biosynthesis of bialaphos. Imai S, Seto H, Sasaki T, Tsuruoka T, Ogawa H, Satoh A, Inouye S, Niida T, Otake N] является трипептидным антибиотиком, который впервые был выделен из *Streptomyces viridichromogenes* или *Streptomyces hygrosopicus*, и состоит из фосфинотрицина (PPT) [14] – аналога L-глутаминовой кислоты и двух остатков L-аланина. После гидролиза данных остатков образуется PPT, который является структурным аналогом глутамата и ингибитором глутаминсинтетазы (GS). GS играет ключевую роль в ассимиляции аммония и регуляции метаболизма азота в клетках растений. Ингибирование GS приводит к быстрой аккумуляции аммония, истощению по глутамину и некоторым другим аминокислотам, падению фиксации CO<sub>2</sub> в процессе фотосинтеза, хлорозу и обезвоживанию растений. Ген *bar* кодирует фосфинотрицинацетилтрансферазу (PAT), которая ацетилирует свободные NH<sub>2</sub>-группы фосфинотрицина (PPT), предотвращая тем самым токсичность этого соединения [15]. Синтетический ген PAT был введён с помощью метода агробактериальной трансформации в геном таких двудольных растений, как табак, томаты, рапс, люцерна и некоторые злаки. Все перечисленные трансгенные растения были устойчивыми к 3-х кратным дозам гербицида Баста.

Активность фермента PAT в клетках растений рапса заявляемой трансгенной линии не определяли. Трансформированные растения обладали устойчивостью к гербициду Баста в условиях, описанных в п. 4.1.

*5.5 Части растения, в которых трансгены экспрессируются (корни, листья, пыльца и т.д.)*

Трансгены находятся под контролем конститутивных промоторов и экспрессируются во всех частях растения.

*5.6. История прежних генно-инженерных модификаций генно-инженерных организмов*

В качестве реципиентных растений при получении заявляемой трансгенной линии рапса были использованы интактные немодифицированные растения рапса сорта Прамень. Растения этого сорта рапса использовались также на кафедре молекулярной биологии в Белорусском государственном университете для получения генно-инженерных вариантов устойчивых к глифосату.

*5.7. Характеристика генно-инженерных организмов в связи с безопасностью для здоровья человека: токсические или аллергенные эффекты генно-инженерных организмов или продуктов, полученных из генно-инженерных организмов*

На основании данных о нуклеотидной и соответствующей аминокислотной последовательности продуктов экспрессии трансгенных вставок заявляемой линии рапса проведен поиск возможных аналогов изучаемых генов, относящихся к аллергенам или токсинам с помощью поисковых систем Allermatch и PepBank. Целевой, белок обладает определенной степенью аллергенности и несет антигенные детерминанты, однако опыт потребления в пищу куриного мяса человеком указывает на низкую вероятность вызывать аллергические реакции. История использования генетических вставок, ответственных за синтез ферментов, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам (селективные факторы), в частности, гена *bar*, свидетельствует об их доказанной биологической безопасности [16], поэтому в соответствии с принципами осведомленности (familiarity) и существенной эквивалентности, изучение биобезопасности этого элемента вставки не проводили.

Таким образом, в результате проведенных исследований по первично оценке биобезопасности трансгенных форм рапса показано, что молекулярно-генетические характеристики продуктов встроенных генов определяют их как не представляющие опасности для здоровья человека и животных.

#### *5.8. Предлагаемые методы обнаружения и идентификации генно-инженерных организмов, их точность, чувствительность, надежность*

Для выявления и идентификации трансгенных растений достаточно простым, надёжным и чувствительным, методом является применение ПЦР-анализа ДНК растений с использованием ДНК-праймеров (см п. 4.7). Метод РНК-ПЦР с использованием ДНК-праймеров является более дорогим и сложным, но более чувствительным, так как копияемость мРНК-транскриптов существенно выше.

#### *6. Информация о потенциальной принимающей среде*

*6.1. Местоположение участка, где будет осуществляться высвобождение (область, район, населенный пункт, принадлежность земельного участка землевладельцу или землепользователю с его полным наименованием)*

Высвобождение будет осуществляться на специально подготовленном участке (далее – полигоне) на Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси, расположенной в Академгородке Академии наук (г. Минск, ул. Ф. Скорины, 34, Первомайский район).

*6.2. Близость к заповедникам, заказникам и другим природоохранным объектам и территориям*

В районе расположения полигона и поблизости каких-либо природоохранных объектов и территорий нет.

### *6.3. Описание участка: размер и обработанность, климатическая, геологическая и почвоведческая характеристика, флора и фауна*

Участок площадью 2200 кв. м расположен на территории опытного поля Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Почва дерново-подзолистая супесчаная, подстилаемая песком, плодородная, окультуренная. Участок огорожен забором (сетка-рабица) высотой 200 см, имеет запираемые ворота. Участок оборудован камерами слежения и находится под визуальным контролем вахтера Биологической опытной станции. Рядом с участком расположен домик для персонала и хранения инструментов.

### *6.4. Сравнение мест естественного обитания реципиентных организмов с предполагаемым местом высвобождения генно-инженерных организмов*

Место предполагаемого высвобождения заявляемой трансгенной линии рапса представляет собой отведённый участок земли на экспериментальном поле ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», на котором выращиваются пшеница, ячмень, подсолнечник и картофель. Таким образом, участок земли для испытаний существенно не отличается от среды обитания культивируемого в республике рапса.

### *6.5. Методы вмешательства в природу участка (методы культивации, ирригации и пр.)*

Подготовка участка для посадки и технология выращивания заявляемой трансгенной линии рапса не отличаются от обычной подготовки почвы – вспашка трактором, боронование, окучивание посаженных растений. В случае необходимости участок может поливаться, поскольку на экспериментальном поле имеется водопроводная сеть.

## *7. Информация о взаимодействии генно-инженерных организмов с окружающей средой*

### *7.1. Биологические особенности генно-инженерных организмов (по сравнению с интактными реципиентными организмами), которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение и распространение в потенциальной принимающей среде*

Трансгенная линия рапса с генами куриного интерферона и *bar* по биологическим свойствам ничем не отличается от реципиентных растений рапса. Поэтому какого-то специфического воздействия принимающей среды на выживаемость, размножение и распространение трансгенной линии рапса не предполагается. Устойчивость к гербициду Баста и его аналогам будет способствовать повышению выживаемости трансгенного рапса на стадии всходов по сравнению с культивируемыми в Беларуси сортами рапса при их обработке гербицидом.

Интенсивность цветения, число завязываемых стручков на центральной кисти, масса 1000 семян и другие морфометрические показатели, определяющие общую продуктивность растений, будут изучаться в полевых

условиях при высвобождении трансгенной линии в окружающую среду по отношению к контрольным растениям сорта Прамень.

*7.2. Известные и прогнозируемые условия потенциальной принимающей среды, которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение, рассеивание генно-инженерных организмов*

На выживаемость и урожайность трансгенной линии, также как и реципиентного рапса, могут оказывать влияние климатические условия в период вегетации, состав почвы, способы её обработки, вносимые удобрения. Поскольку рапс является факультативным самоопылителем (перекрестное опыление у яровой формы составляет 2-5%, у озимой – до 30%), следовательно, требуется искусственная изоляция посевов трансгенной формы рапса на расстояние не менее 2,5 км от ближайших посевов рапса и других диких и культивируемых видов рода *Brassica* (капусты, сурепицы, горчицы чёрной и сарептской и др.), а также от пчеловодческих пасек.

В связи с легкой скрещиваемостью рапса со всеми видами рода *Brassica* есть риск засорения трансгенными формами рапса вышеуказанных крестоцветных культур при малейшем отклонении от требуемых расстояний изоляции а также при несоблюдении других технологических приемов, связанных с уборкой, доработкой, хранением семян, что может привести к механическому смешиванию семян трансгенного рапса с семенами обычных сортов и гибридов и к неконтролируемому распространению трансгенных форм рапса.

*7.3. Конкурентное преимущество генно-инженерных организмов (по сравнению с интактными реципиентными организмами)*

Конкурентное преимущество растений рапса заявляемой трансгенной линии в отличие растений исходного сорта Прамень состоит в способности трансгенных растений проявлять полевую устойчивость гербициду Баста и его аналогам, так как интактные растения рапса будут погибать в результате такой обработки.

*7.4. Вероятность проявления у генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде нежелательных свойств, признаков*

Вероятность проявления нежелательных свойств и признаков у заявляемой трансгенной формы рапса несущественная.

*7.5. Вероятность резкого увеличения численности популяции генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде*

Рапс – культурное растение, которое размножается семенами, следовательно, требуется контроль и своевременная уборка урожая. Заявляемая трансгенная линия не обладает свойствами, которые позволили бы ей, в отличие от исходного сорта, резко увеличить численность в окружающей среде.

7.6. *способность к переносу генетической информации: наличие в потенциальной принимающей среде диких или культурных родственных видов, способных к гибридизации с генно-инженерными организмами, вероятность переноса трансгенов от генно-инженерных организмов к таким организмам*

Рапс относится к семейству крестоцветных и является факультативным самоопылителем. Доля перекрестного опыления у ярового рапса составляет 2-5%, у озимой формы – до 30%. В перекрестном опылении участвуют насекомые-опылители, в частности, пчелы (*Apis mellifera*) и шмели (*Bombus sp.*). Для исключения доли перекрестного опыления производится искусственная изоляция центральной кисти или всего растения, а также территориальная изоляция – 2,5 км до ближайших посевов рапса. При использовании шмелей в качестве насекомых-опылителей для повышения урожайности сельскохозяйственных растений-перекрестников рекомендуемое максимальное расстояние размещения ульев от поля, например клевера, составляет 150 метров. Таким образом, размещение посадок трансгенного рапса от нетрансгенного на расстоянии, превышающем 150-200 метров, может рассматриваться достаточным изолирующим фактором для предотвращения переноса пыльцы и, соответственно, переноса чужеродного генетического материала к немодифицированным растениям рапса и другим представителям рода *Brassica*.

7.7. *Идентификация и описание организмов-мишеней продуктов трансгенов*

Организмов-мишеней продуктов трансгена в данном случае не существует. Мишенью или субстратом для продукта встраиваемого гена является химическое соединение. В частности, ген *bar* кодирует фермент фосфинотрицинацетилтрансферазу, который инактивирует действие фосфинотрицина на чувствительные растительные клетки. Мишенью для белка альфа-интерферона являются специфические рецепторы клеток тканей домашней курицы *Gallus gallus*.

7.8. *Предполагаемый механизм и результат взаимодействия генно-инженерных организмов с организмами-мишенями*

У заявляемой трансгенной линии рапса отсутствуют организмы-мишени. Трансгенные растения характеризуются устойчивостью к фосфинотрицину и при обработке соответствующим гербицидом не погибают. Аминокислотная последовательность белка альфа-интерферона полностью идентична таковому, синтезирующемуся в куриных клетках.

7.9. *Идентификация и описание организмов, не являющихся мишенями продуктов трансгенов, которые могут быть подвержены влиянию генно-инженерных организмов*

См. п.2.3, п.7.7, п.7.8.



*7.10. Другие потенциально возможные взаимодействия генно-инженерных организмов с окружающей средой*

Каких-либо других специфических потенциально возможных взаимодействий трансгенных растений с окружающей средой не предполагается.

*7.11. Информация, касающаяся предполагаемого вида использования генно-инженерных организмов, включая новый или измененный вид использования по сравнению с организмом реципиентом*

Созданная трансгенная линия рапса отличается от реципиентного сорта рапса наличием экспрессируемого гена куриного альфа-интерферона, обеспечивающего биосинтез биологически активного регуляторного цитокина, обладающего противовирусным, иммуномодулирующим и антипролиферативным действием при введении в организм домашней курицы *Gallus gallus*. Растения, синтезирующие интерферон, предполагается использовать на птицефабриках в виде кормовой добавки, состоящей из растительных тканей или плодов, в лечебных (борьба с вирусными инфекциями) и профилактических (повышение иммунитета) целях.

*8. Информация об осуществлении высвобождения генно-инженерных организмов в окружающую среду, о мониторинге, контроле, очистке территории и действиях при непредвиденных обстоятельствах в ходе высвобождения и проведения испытаний*

*8.1. Информация о высвобождении генно-инженерных организмов*

Целью посадки созданной трансгенной линии рапса на специальном полигоне является получение растений, стабильно наследующих трансгенные признаки: накопленилнутриклеточного белка куриного альфа-интерферона и устойчивость к действию гербицида Баста и его аналогов.

Для посадки растений участок будет вспахан и заборонен как обычно. Посадка будет производиться вручную рядами. Расстояние 0,7 м между рядами, 0,35 м между растениями в ряду. Через 7 дней после посадки будет проведено довсходовое культивирование. Будет высажена одна трансгенная линия. Посадка будет осуществляться в оптимальные для посадки рапса сроки, т.е. в конце апреля-начале мая 2016 г.

Поблизости от участка никаких диких и культурных родственных видов, способных к гибридизации с трансгенным рапсом, нет.

Высвобождение данной формы генно-инженерных организмов в окружающую среду предполагается произвести впервые в Беларуси.

*8.2. методы мониторинга:*

В течение и по окончании вегетационного периода будут проводиться анализы по выявлению и стабильности встраивания трансгенов в геном растений, по определению содержания целевого белка, а также предельно допустимых концентраций гербицидов, применяемых для отбора ГИО.

Передача трансгенов другим организмам будет выявляться результате анализа геномной ДНК методом ПЦР. Такой анализ будет проведен для контрольных растений, выращиваемых на полигоне.

#### *8.3. Контроль высвобождения генно-инженерных организмов:*

Для предотвращения рассеивания пыльцы и семян будет применена искусственная изоляция соцветий, а также территориальная изоляция на расстоянии 2,5 км от ближайших посевов рапса. Семенной материал будет тщательно собран, подвергнут сортировке, упакован и перенесен на хранение в лабораторных условиях для использования в дальнейших исследованиях.

Трансгенные растения будут высаживаться на специальном полигоне, огороженном оградой – металлической сеткой с воротами, которые будут закрываться на замок. Территория полигона будет охраняться от проникновения животных и посторонних лиц путём контроля с использованием камер слежения и звуковой сигнализации.

#### *8.4. Очистка территории:*

По завершении вегетационного периода после сбора семян вся надземная часть и корневая система растений будут захораниваться в могильнике (специально вырытой яме), находящемся на территории полигона. Участок будет вспахан и заборонован.

#### *8.5. План действий в чрезвычайных ситуациях, связанных с непредвиденным распространением генно-инженерных организмов:*

Использование специального закрытого полигона для выращивания и испытания трансгенных растений с соответствующей системой безопасности, а также биологические особенности рапса не предполагают непредвиденного распространения трансформантов. В случае, если все-таки произойдет несанкционированный вынос семян трансгенной линии посторонними лицами, это не должно иметь неблагоприятных последствий, так как имеющиеся данные указывают на безопасность заявляемой трансгенной линии для здоровья человека и окружающей среды.

### Список литературы

- 1 Cardoza, V. Brassica biotechnology: Progress in cellular and molecular biology/ V. Cardoza, C. N. Jr. Stewart // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2003. – V. 40. – P. 542-551.
- 2 Maheshwari, P. Optimization of Brassica napus (canola) explant regeneration for genetic transformation/ P. Maheshwari, G. Selvaraj, I. Kovalchuk // New Biotech. – 2011. – V. 29. – P. 144-155.
- 3 Характеристика курицы домашней. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://gorsun.org.ru/lib/children/researcher12/chicken/02>. Дата доступа: 25.05.2015./

- 4 Karimi, M. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation / M. Karimi, D. Inzé, A. Depicker // Trends Plant Sci. – 2002. – V. 7. – P. 193–195.
- 5 The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation/ P.Hajdukiewicz [et al.] // Plant Mol. Biol. 1994. – V. 25. – P. 989–994.
- 6 pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation / R.P. Hellens, [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2000. – V. 42. – P. 819–832.
- 7 Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter / J.T. Odell [et al.] // Nature –1985. – V. 313. – P. 810–812.
- 8 Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation / D.R. Gallie [et al.] // Plant Cell – 1989. – V. 1. – P. 301–311.
- 9 Supartana et. al. 2005
- 10 Kojima et al.
- 11 Hoerlein, G. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties /G. Hoerlein // Rev. Environ. Contam. Toxicol.– 1994. – V. 138 . – P. 73-145.
- 12 Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / Ермишин А.П. [и др.]; под ред. А.П. Ермишина // Мн.: Тэхналогія, 2005. – 430 с.
- 13 Seto, H. Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293) / H. Seto [et al.] // J. Antibiot. (Tokyo) – 1984. – V. 37. – P. 1505-1508.
- 14 Bayer, E. Phosphinothricin und Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin / E. Bayer [et al.] // Helv. Chim. Acta – 1972. – V. 55. – P. 224–239.
- 15 Murakami, T. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus* : molecular cloning of the gene cluster / T. Murakami [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1986.– V. 205. – P. 42-50.
- 16 Moens, W. Plants containing antibiotic resistance genes / W. Moens, J.M. Collard // GM Belgian Biosafety Server [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://biosafety.ihe.be/ARGMO/ARGMOmenu.htm> Дата доступа: 04.12.2002.

Генеральный директор РУП  
«Научно-практический центр  
НАН Беларуси по земледелию»



*Ф.И. Привалов*

Ф.И. Привалов

Зав.лаб. генетики и биотехнологии  
РУП «Научно-практический центр  
НАН Беларуси по земледелию»

*С.И. Гордей*

С.И. Гордей