

КОНТРОЛЬ БЕЗПЕЧНОСТІ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ ЗА ПОКАЗНИКОМ ГМО. ПОРІВНЯННЯ МЕТОДИК ВИДІЛЕННЯ ДНК

Г. В. Кушнір, канд. вет. наук

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок,
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

У статті наведені результати досліджень, які були проведені у лабораторії кормових добавок та преміксів Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок щодо наявності генетично модифікованих організмів у рослинній сировині, яка надходила від сільськогосподарських виробників Львівської області. Дослідження проводились за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (ПЛР-РЧ) з використанням наборів ЗАО "Синтол" (Росія) та R-Biopharm AG (Німеччина). Проведена порівняльна оцінка двох методик по виділенню ДНК із рослинної сировини та встановлено, що за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в "Реальному часі" та описаних методик можна швидко і якісно провести дослідження рослинної сировини за показником ГМО.

Ключові слова: ГЕННО МОДИФІКОВАНІ ОРГАНІЗМИ, ПЛР-РЧ, РОСЛИННА СИРОВИНА, БІОБЕЗПЕКА, ДІАГНОСТИЧНІ ТЕСТ-СИСТЕМИ.

Генна інженерія, як складова сучасної біотехнології, відноситься до одних із пріоритетних напрямків наукової та виробничої діяльності людини. Закономірним підсумком бурхливого розвитку генної інженерії упродовж останніх десятиліть стало широке впровадження у сільськогосподарське виробництво різноманітних генетично модифікованих (ГМ) сортів рослин. Генетично модифіковані організми (ГМО), або їх ще називають трансгенні організми — це продукти створені шляхом введення в клітини фрагментів чужої або зміненої власної ДНК. Метою створення ГМ рослин є надання їм нових властивостей, таких як, наприклад, стійкість до гербіцидів, шкідників, несприятливих факторів зовнішнього середовища, підвищення урожайності тощо. З огляду на це ГМО — це новий тип організмів, які не існують у природі. Саме тому до таких продуктів, що отримані з використанням генетично модифікованих джерел (ГМД), варто застосовувати термін "нові продукти" і принцип "обережності" (precautionary principle) [1–3].

У провідних державах світу по різному ставляться до ГМО. У США, наприклад, розширюються рамки законопроектів, що допускають включення без обмежень продуктів трансгенного сільського господарства в комерційний обіг [4]. У країнах Європейського союзу визнають необхідність проведення науково обґрунтованої оцінки безпеки рослин і тварин, одержуваних у результаті генної інженерії. Тому в Австрії, Великобританії, Греції, Люксембурзі, Франції й деяких інших країнах введений мораторій на ввіз ГМ харчової сировини та продуктів його переробки. У ряді держав ЄС прийнятий закон про обов'язкове маркування харчової продукції, що містить більше 1% трансгенних компонентів. Обов'язкове маркування ГМ продукції введене у Великобританії, Німеччині, Люксембурзі, Нідерландах, Норвегії, Франції, Швейцарії, Швеції, тоді як в Австралії, Канаді, Новій Зеландії, США та деяких інших країнах генетично змінені продукти харчування маркують тільки за бажанням виробника [5].

Дискусія щодо обігу в Україні ГМО ведеться вже протягом багатьох років. Для врегулювання всіх питань пов'язаних з використанням ГМО в Україні 31 травня 2007 року

Верховною Радою був прийнятий закон № 1103-V "Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів". Цей закон регулює відносини між органами виконавчої влади, виробниками, продавцями (постачальниками), розробниками, дослідниками, науковцями та споживачами ГМО та продукції, виробленої за технологіями, що передбачають їх розробку, створення, випробування, дослідження, транспортування, імпорту, експорту, розміщення на ринку, вивільнення у навколишнє середовище та використання в Україні із забезпеченням біологічної і генетичної безпеки. Окрім того, згідно постанови КМУ № 468 прийнятої в Україні у травні 2009 року всі продукти харчування, що містять генетично модифіковані організми обов'язково повинні мати маркування. Найвищий рівень ГМО в харчовій продукції, що не потребує маркування становить 0,9% [6, 7].

Поява на ринку ГМ сортів рослин спричинила необхідність контролю за якісним та кількісним вмістом ГМ інгредієнтів у продуктах харчування. Найпоширенішими нині методами якісного та кількісного аналізу генетично модифікованих організмів є хімічний (виявлення змін хімічного складу), імуноферментний (ІФА, виявлення модифікованого білка за допомогою специфічних антитіл) та метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, виявлення рекомбінантної ДНК). Хімічний метод аналізу є досить чутливим, однак вимагає наявності дороговартісного обладнання і висококваліфікованого персоналу. Метод ІФА аналізу дозволяє виявити лише продукти експресії рекомбінантної ДНК. На противагу цьому метод ПЛР дозволяє виявити безпосередньо рекомбінантну ДНК, за рахунок високої чутливості методу. Наявність рекомбінантної ДНК можна виявити в дуже малих концентраціях і в будь-якому продукті чи сировині. Перевагами методу є висока специфічність, універсальність, доступність і скорочення часу проведення дослідження [8, 9].

В основі ПЛР лежить багаторазове повторення циклів денатурації ДНК-матриці, відпалу з нитками ДНК специфічних праймерів і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою термостабільної ДНК-полімерази. У результаті ПЛР відбувається збільшення у геометричній прогресії кількості копій синтезованого фрагмента, що дозволяє виявити специфічну ділянку генома біологічного агента і забезпечує високу чутливість методу. Специфічність ПЛР визначається здатністю праймерів точно розпізнавати певну ділянку нуклеїнової кислоти і зв'язуватися з нею за принципом компліментарності. Метод ПЛР забезпечує можливість роботи з будь-яким видом біологічного матеріалу і проведення досліджень в короткий термін часу (упродовж 4-8 год). Кожен цикл ПЛР складається з трьох стадій: Денатурація – руйнування молекули ДНК при температурі 93-95 °С, при цьому нитки ДНК роз'єднуються і стають доступними для праймерів. Відпал – реакційна суміш охолоджується до оптимальної температури 50-65 °С і праймери приєднуються в напрямку 3' кінця ланцюга ДНК, по одному на кожен ланцюг. Елонгація – подовження нового ланцюга ДНК при температурі 72 °С, за рахунок приєднання нуклеотидів за принципом компліментарності. Тристадійний цикл, в результаті якого утворюються точні копії ДНК, повторюється 30-50 разів. З кожним новим циклом кількість копій фрагментів ДНК зростає в геометричній прогресії [10].

Для ПЛР у "реальному часі" використовують флуоресцентно мічені олігонуклеотидні зонди. Цей метод дозволяє проводити моніторинг і кількісний аналіз нагромаджених продуктів реакції, оскільки кінетика нагромадження пов'язана із вихідною кількістю матриці НК. Використання математичних методів аналізу результатів дослідження дозволяє автоматизувати їх інтерпретацію, тим самим зняти проблему суб'єктивної оцінки результатів електрофореграм [11].

Метою нашої роботи було проведення контролю рослинної сировини, яка надходили від сільськогосподарських виробників за показником ГМО та провести порівняльну оцінку методик виділення ДНК із дослідних зразків за допомогою наборів двох різних виробників ЗАО "Синтол" (Росія) та R-Biopharm AG (Німеччина).

Матеріали і методи. Контроль рослинної сировини на предмет виявлення ГМ джерел здійснювали за допомогою діагностичних тест-системи "35S/NOS скрининг", "Соя 35S/NOS скрининг", "Картофель /Gry 3A скрининг", "Pat /EPSPS/ Bar скрининг", SureFood PREP Plant, SureFood GMO Screen "35S+NOS+FMV", "Соя GTS 40-3-2 ідентифікація", "Соя GTS A 2704-12 ідентифікація", "Соя GTS A 5547-127 ідентифікація", "Соя /GTS 40-3-2 кількість" та ампліфікатор АНК-32, який дозволяє з високою точністю визначати наявність і кількість генетично модифікованої ДНК із дослідних зразків.

При використанні тест-системи ЗАО "Синтол" (Росія, методика 1) в мікропробірки вносили по 50-100 мг дослідного зразка, додавали по 800 мкл лізуючого буферу і 15 мкл протеїнази К. Ретельно перемішували на вортексі та інкубували за температури 60 °С упродовж 30 хв., періодично перемішуючи (кожні 5-10 хв.). Потім пробірки охолоджували 1-2 хв. і центрифугували 5 хв. при 12000 об./хв. Під час лізису і центрифугування готували осаджуючий реактив. Для цього в нові пробірки на 1,5 мл вносили 200 мкл буферу і 40 мкл сорбенту. Верхню водну фазу із пробірок із зразків в об'ємі 100-300 мкл переносили окремим наконечником з аерозольним бар'єром в пробірки з осаджуючим реактивом. Інтенсивно перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбенту та інкубували 10 хв. при кімнатній температурі, періодично струшуючи пробірки. Потім пробірки центрифугували 1 хв. при 7000 об./хв. Видаляли супернатант, використовуючи окремий наконечник для кожної проби. Додавали 300 мкл промивочного розчину № 1, інтенсивно перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбенту і центрифугували пробірки 1 хв. при 7000 об./хв. Потім двічі додавали до осаду промивочного розчину № 2 і повторювали промивання. Після чого відкриті пробірки ставили на 10-15 хв в термостат, за температури 60°C, для повного випарування рідини. До сухого залишку додавали 100 мкл ТЕ-буферу, інтенсивно перемішували та інкубували 5 хв. при температурі 60°C (перемішуючи кожні 2 хв.). Центрифугували суспензію 2 хв. при 12000 об./хв., чисту надосодову рідину у кількості 70 мкл відбирали в чисті пробірки для постановки ПЛР.

При використанні тест-системи R-Biopharm AG (Німеччина, методика 2) в мікропробірки вносили по 50 мг дослідного зразка, додавали по 400 мкл підігрітого лізуючого буферу і 20 мкл протеїнази К. Ретельно перемішували на вортексі та інкубували за температури 65°C упродовж 30 хв., періодично перемішували (кожні 5-10 хв.). Потім пробірки охолоджували 1-2 хв. і центрифугували 2 хв. при швидкості 12000 об./хв. Прозорий лізат переносили на центрифужний фільтр (NucleoSpin) у нові пробірки на 2 мл і центрифугували пробірки з лізатом упродовж 2 хв. при швидкості 12000 об./хв. Після чого центрифужний фільтр відкидали, а до лізату додавали 200 мкл зв'язуючого буферу, добре перемішували на вортексі та інкубували при кімнатній температурі 1 хв. Переносили розчин у нові пробірки з центрифужним фільтром (NucleoSpin), центрифугували 2 хв. при швидкості 12000 об./хв., фільтрат відкидали, а фільтр ставили назад у пробірку і вносили по 550 мкл промивочного розчину № 1, центрифугували 1 хв. при швидкості 12000 об./хв. Фільтрат відкидали, а фільтр ставили назад у пробірки та промивали два рази розчином № 2 у кількості 550 мкл. Центрифугували сухий фільтр 2 хв. при швидкості 12000 об./хв., для того, щоб видалити всі залишки миючого буферу. Потім переносили його у чисту прозору пробірку на 1,5 мл і вносили 100 мкл гарячого буферу для елюації. Інкубували 3 хв. при кімнатній температурі та центрифугували 2 хв. при швидкості 10000 об./хв. Центрифужний фільтр викидали, а виділена ДНК була готова для постановки ПЛР.

Аналіз ДНК. Безпосередньо перед аналізом ДНК готували реакційну суміш. Для цього проводили розрахунок необхідної кількості пробірок, враховуючи при цьому по дві для дослідних зразків, по дві для контролю виділення (для перевірки чистоти реактивів при виділенні ДНК) та негативного та позитивного контролів. Реакційну суміш готували з контрольних реакційних сумішей та додавання ДНК-полімерази. Після інтенсивного перемішування і короткочасного центрифугування реакційну суміш у кількості 20 мкл

вносили в пробірки на 0,2 мл, куди додавали по 5 мкл виділеної ДНК дослідних зразків. Потім пробірки перемішували і центрифугували 20 сек для скидання крапель. Зразки готові для проведення ампліфікації. Прилад програмували під кожну методику.

Результати й обговорення. Дослідження ГМО джерел у рослинній сировині проводили шляхом виявлення у дослідних зразках цільових послідовностей промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) і (або) термінатора NOS (T-NOS) T1 плазмиди *Agrobacterium tumefaciens* методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ). В основі методу лежить детектування сигналу флуоресценції, що дозволяє спостерігати процес нагромадження продукту в процесі реакції. Сигнал флуоресценції наростав пропорційно збільшенню кількості продукту ампліфікації в досліджуваному зразку. Момент помітного збільшення сигналу і відрив його від базової лінії, так званий пороговий цикл, залежав від початкової кількості ДНК – мішені. Чим більша кількість ДНК в зразку, тим швидше спостерігали початок зростання сигналу флуоресценції. Описана методика дозволяє ідентифікувати і кількісно визначати ГМО в рослинній сировині за допомогою полімеразної ланцюгової реакції "в реальному часі".

При проведенні виділення ДНК маса наважки дослідних зразків суттєво по цих двох методиках не відрізнялася, однак у методиці 1, зразки розділені на рідкі та сипучі (табл. 1). В методиці 2 на стадії лізису при додаванні лізуючого буферу температура в термостаті для інкубації була на 5°C вища. Але основною відмінністю цих двох методик було те, що для виділення ДНК на стадії відмивання і преципітації використовували різні способи. В першому випадку для відмивання ДНК використовували сорбент у вигляді емульсії, у другому – колонки NucleoSpin (центрифужні фільтри) з нанесеним шаром сорбенту, які поміщали на спеціальні пробірки. Ці дві методики різняться ще різною швидкістю центрифугування на стадії виділення ДНК. При порівнянні вартості наборів суттєвої різниці між ними не було.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика методик на етапі виділення ДНК

Показники	Методика 1	Методика 2
Маса наважки, мг	50-300	100-200
Очистка ДНК	Сорбент у вигляді емульсії	колонки NucleoSpin (центрифужні фільтри)
Температура інкубації, °C	60	65
Швидкість центрифугування, об/хв	7000-12000	12000
Час центрифугування за весь період виділення, хв	11	14
Час проведення виділення, хв	120	130
Вартість наборів для проведення досліджень, гр.	8290	8976

При порівнянні етапу аналізування ДНК встановили, що запропоновані методики різняться кількістю циклів у програмі та часу проведення реакцій, при цьому кількість приготованої реакційної суміші і внесеної ДНК для проведення реакції однакова. Основною різницею між цими двома методиками є те, що при програмуванні приладу кількість мішеней різні (табл. 2).

У подальшому виділення ДНК з рослинної сировини здійснювали за допомогою наборів двох різних виробників (ЗАО "Синтол" (Росія) та R-Biopharm AG (Німеччина). За 8 місяців 2015 рік у лабораторії кормових добавок та преміксів Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок було досліджено 205 зразків рослинної сировини на наявність ГМ джерел. Зокрема, досліджувались зразки зернових (пшениця, жито, ячмінь, соя, ріпак, льон тощо), коренеплодів (картопля) та деяких продуктів переробки рослинної сировини (борошно пшеничне, соєве, шрот та олія соєва тощо). Результати досліджень наведені у таблиці 3.

Таблиця 2

Порівняльна характеристика методик на етапі аналізування ДНК

Показники	Методика 1	Методика 2
Кількість приготованої реакційної суміші, мкл	20	20
Кількість внесеної ДНК для проведення реакції, мкл	5	5
Кількість мішеней	2	4
Кількість циклів	50	45
Температурний режим	95°C – 5 хв. 1 цикл 60°C – 40 с 95°C – 15 с	95°C – 5 хв. 1 цикл 95°C – 15 с 60°C – 30 с
Час проведення аналізу, хв.	120	110

Таблиця 3

Дослідження рослинної сировини на наявність ГМО

Сировина рослинного походження	Негативні проби	Позитивні проби	Кількість зразків
Пшениця	25	-	25
Соя	11	-	11
Ячмінь	38	-	38
Кукурудза	3	-	3
Соняшник	1	-	1
Ріпак	64	6	70
Овес	2	-	2
Жито	2	-	2
Картопля	22	-	22
Хміль	1	-	1
Гречка	2	-	2
Льон	1	-	1
Висівки пшеничні	1	-	1
Борошно пшеничне	-	5	5
Борошно соєве	17	-	17
Макуха соєва	3	3	6
Олія соєва	4	-	4
Всього	197	14	211

Як видно з даних, наведених в таблиці 3, із загальної кількості зразків, які надійшли на дослідження, позитивних проб виявили 14, що становило 6,6%. При дослідженні 70 зразків насіння ріпаку у шести пробах, що становило – 8,6%, було виявлено ГМ джерела.

При дослідженні 6 зразків соєвої макухи ГМ компоненти у своєму складі містили 3 зразки, що становило 50%. При дослідженні 5 зразків соєвого борошна у всіх було виявлено ГМ інгредієнти. У позитивних зразках соєвого борошна та макухи було ідентифіковано ГМ сою лінії GTS 40-3-2 (Roundup ready 40-3-2). У соєвому борошні за допомогою тест-систем "Соя /GTS 40-3-2 количество" було визначено кількісний вміст ГМО, відсоток ГМ інгредієнтів становив 0,9 – 2,4%.

Отже, отримані позитивні результати вказують на те, що в Україні вирощуються і реалізуються ГМ рослини.

ВИСНОВКИ

1. Позитивні результати досліджень по виявленню ГМО в рослинній сировині вказує на наявність трансгенних рослин в Україні, тому необхідно постійно проводити її контроль оскільки проблема біобезпеки ГМО і оцінки потенційних ризиків від їх використання ще до кінця не вивчені.

2. Проведена порівняльна оцінка двох методик по виділенню ДНК із рослинної

сировини та встановлено, що за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в "Реальному часі" та описаних методик можна швидко і якісно провести дослідження рослинної сировини за показником ГМО.

3. За результатами проведених досліджень виявлено, що із загальної кількості зразків відсоток позитивних становив – 6,6%. Позитивні проби були виявлені у зразках ріпаку, соєвому борошні та макусі.

Перспективи подальших досліджень. Проводити якісне та кількісне дослідження рослинної сировини на виявлення ГМ інгредієнтів.

THE CONTROL OF SAFETY OF PLANT MATERIALS IN TERMS OF GMO. THE COMPARISON OF METHODS OF DNA ISOLATION

G. W. Kuchnir

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

The article present the result of studies that were conducted in the laboratory of control of feed additives and premix, of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives on the availability of genetically modified organisms in plant material, that came from farms of Lviv region. Research were conducted by the method of polymerase chain reaction in real time (RCH PCR) by using sets of ZAO "Syntol" (Russia) and R-Biopharm AG (Germany). It was conducted comparative evaluation of two methods for the isolation of DNA from plant material and was found that by polymerase chain reaction in "real time" and by using two techniques can quickly and efficiently conduct a study of plant material in terms of GMO.

Keywords: GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS, PCR-RT, DIGISTER, BIOSAFETY, DIAGNOSTIC TESR-SYSTEM.

КОНТРОЛЬ БЕЗОПАСНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЗА ПОКАЗАТЕЛЕМ ГМО. СРАВНЕНИЕ МЕТОДИК ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК.

Г. В. Кушнир

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных
препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены результаты исследований, которые были проведены в лаборатории кормовых добавок и премиксов Государственного научно-исследовательского контрольного института ветеринарных препаратов и кормовых добавок о наличии генетически модифицированных организмов в растительном сырье, которое поступала от сельскохозяйственных производителей Львовской области. Исследования проводились с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием наборов ЗАО "Синтол" (Россия) и R-Biopharm AG (Германия). Проведена сравнительная оценка двух методик по выделению ДНК из растительного сырья и установлено, что с помощью полимеразной цепной реакции в "Реальном времени" и

описанных методик можно быстро и качественно провести исследования растительного сырья по показателю ГМО.

Ключевые слова: ГЕННО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОРГАНИЗМЫ, ПЦР-РВ, РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ, БИОБЕЗОПАСНОСТЬ, ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Сиволап Ю. Генна інженерія - ключовий напрям сучасної біотехнології / Ю. Сиволап // Пропозиція. — 2009. — № 2. — С. 44–45
2. Елдышев Ю. Н. Современная биотехнология. Мифы и реальность / Ю. Н. Елдышев, А. Л. Конов. — Москва, 2004. — 196 с.
3. Кузнецов В. В. Генетически модифицированные риски и полученные из них продукты: реальные и потенциальные риски / В. В. Кузнецов, А. М. Куликов // Российский химический журнал. — 2005. — Т. 69, № 4. — С. 70–83
4. Benbrook C. M. Impacts of Genetically Engineered Crops on Pesticide Use in the United States: The First Eight Years / C. M. Benbrook // Bio Tech Info Net Tech. Paper. 2003. — № 6. — P. 46.
5. Conner A. J. The release of genetically modified crops into the Environment. Part II. Overview of ecological risk assessment / A. J. Conner, T. R. Glare, J. P. Nap // The Plant Journal. — 2003. — V. 33. — P. 19–46.
6. "Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів": Закон України від 31 травня 2007 року № 1103-V // Відомості Верховної Ради України. — 2007. — № 35. — С. 484.
7. Електронний ресурс: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/468-2009-%D0%BF>
8. Schwagete F. Analytik bei Fleisch Bewertung immunologischer und gentechnischer Methoden / F. Schwagete // Fleischwirtschaft. — 2001. — Т 81. № 2 — S 78–81.
9. ПЦР "в реальном времени" / Ребриков Д. В., Саратов Г. А., Трофимов Д. Ю. и др.: под ред. Д. В. Ребрикова — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. — 223 с.
10. Пат. 2259401 Росия МПК С 12 З 19/34 С 12 Q Сухая смесь реагентов для полимеразной цепной реакции и способ проведения ПЦР анализа / Шайхаев Г.О. — № 2004112594/13; заяв. 20.04.2004; опубл. 27.08.2005 г.
11. Zhu D. Rapid detection of genetic variations using an automated capillary electrophoresis system. / Zhu Dan // The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy New Orleans La, March 17-22, 2002 PITT-CON 2002, Global Technical Conference and Exposition Book: Abstr. — New Orleans La, 2002. — P. 540.

Рецензент – В. О. Величко, д. вет. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.