

УДК 001.53: 575. 856: 577.21

Назар Б. І., к. вет. н.¹ ©*Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів*

МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ОРГАНІЗМІВ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ В УКРАЇНІ

Проведені моніторингові дослідження продукції з використанням розроблених методик показали можливість їх використання для скринінгових та кількісних тестів виявлення незадекларованих ГМО у продуктах рослинного походження.

Вступ. Визначення генетично модифікованих організмів у продуктах проводять за допомогою молекулярно-генетичних методів, в основі яких лежать генно-інженерні маніпуляції з ДНК і РНК. Ця велика група методів призначена для виявлення варіацій (пошкоджень), починаючи із структури ділянки ДНК (алеля, гена, регіона хромосоми) і закінчуючи тиск нтозами первинної послідовності основ. Оскільки один ген може кодуватися 10000 і більше нуклеїнових кислот, то спеціалісти лабораторії повинні володіти необхідними знаннями і методиками, що дозволять розшифрувати й аналізувати всю генетичну послідовність.

Так, молекулярні генетики виділяють ДНК із клітин і за допомогою спеціальних хімічних реакцій та приладів розшифровують ген, що аналізується. До методів, що найчастіше використовуються для виявлення генетичних модифікацій, відносять ПЛР (полімеразно ланцюгова реакція) і секвенування. Основними елементами скринінгу можуть слугувати такі послідовності, як 35S промотор, NOS-термінатор, rat чи маркерні ДНК послідовності для офіційно затверджених та схвалених для споживання ГМО (Mon810, Vt11, GT73 та ти.). Саме потенційно висока чутливість цих методик вимагає особливо ретельного обладнання ПЛР-лабораторії.

Аналізи на вміст ГМО не можуть виконуватись у звичайних аналітичних лабораторіях, оскільки для цього необхідне дороге обладнання, реактиви, висококваліфікований персонал, що володіє різноплановими біологічними методами.

На сьогодні в Україні офіційно застосовуються два методи: полімерної ланцюгової реакції (PCR) та імунологічний Elisa-тест (дані методи впроваджено в ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок). Метод PCR не досконалий через те, що він працює з базою вже відомих білків і змін ДНК. Нові ж, нещодавно створені, білки він виявити не може. Недолік Elisa-тесту в тому, що він не здатний визначити ГМО після теплової обробки продукту, тобто у вареному продукті визначити генетичні модифікації цим методом уже

¹ Науковий консультант — д. вет. н., професор, членкор НААН І.Я. Коцюмбас
© Назар Б. І., 2013

не можна. Крім того, обидва методи вимагають великих витрат часу – на визначення ГМО витрачається 1,5-2 доби. При цьому експертиза одного зразка на присутність ГМО коштує від 400 до 600 грн. Якщо ж потрібно визначити кількість ГМО – це ще 1100-1200 грн. Близько 1 млн тис. коштує саме устаткування.

В Донецькому національному університеті економіки і торгівлі імені М. Туган-Барановського є спроби розробити біофізичний експрес-метод визначення ГМО який заснований на різниці між результатами світіння продуктів, які містять ГМО, і тими, які їх не містять приладом який являє собою газорозрядну камеру. Суть самого методу полягає в тому, що під дією коротких електричних імпульсів з поверхні біологічного об'єкту (сировини або продукту) відбувається випускання електронів і фотонів, які утворюють світіння. Так-от, продукти, що містять ГМО, мають світіння, відмінне від звичайних продуктів. Недолік цього методу полягає в тому, що за його допомогою можна визначити лише наявність ГМО, але не його кількість.

Лабораторій, здатних проводити якісну і кількісну експертизу ГМО в продуктах харчування та кормах, в Україні близько двадцяти. Серед них — лабораторія контролю кормових добавок та преміксів ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок. Слід зазначити, що ця лабораторія обладнана сучасним аналітичним обладнанням від провідних світових виробників. Фахівці лабораторії мають значний досвід роботи з проведення випробувань методом полімеразно-ланцюгової реакції (основний скринінговий метод для визначення ГМО в зразку), виконання гібридаційного і рестрикційного аналізу, аналізу функціонування вставки (ОТ-ПЛР і вивчення продукції білка чужерідної ДНК), секвенування і т. д.

Матеріали і методи. Для проведення порівняльної оцінки ми використовували різні методичні підходи на різних етапах проведення реакції ПЦР.

Оскільки ефективність методу ПЛР, як і інших методів аналізу ДНК, залежить від якості і чистоти виділеної ДНК, якість ДНК визначається довжиною фрагментів і ступенем їх пошкодження під дією тепла, кислот та інших речовин, що викликають гідроліз чи ферментативну деградацію. Саме якість ДНК може змінюватись залежно від вихідного матеріалу, ступеня його нативності та від методів екстрагування. Нами були застосовані методи екстрагування ДНК за допомогою цетилтриметиламонійброміду (ЦТАБ), тиск нтоза метод та комбінація цих методів.

Загалом процес екстракції ДНК складався з таких стадій:

1. Руйнування кліткової стінки тканин.
2. Руйнування кліткової мембрани за допомогою детергенту.
3. Інактивація ендогенних нуклеаз за допомогою детергенту та етилендіамінтетраоцтової кислоти. При цьому зв'язувались іони Mg^{2+} , які є кофакторами багатьох нуклеаз. У деяких випадках для розщеплення білків додавали тиск нтоза К.
4. Відділення тиск нто полісахаридів.

5. Видалення гідрофобних компонентів, ліпідів і тиск нтозам.

6. Остаточне видалення детергенту і концентрування ДНК.

Якісне визначення ГМО засноване на ідентифікації генетично модифікованих регуляторних послідовностей – як правило, це 35S-промотор і NOS-термінатор, які найпоширеніші у промислових генетично модифікованих культурах. У ході аналізу одночасно в одній пробірці проходять три незалежні реакції. Перша реакція дає змогу виявити фрагмент ДНК 35S-промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV). Друга реакція дає змогу виявити фрагмент ДНК-NOS термінатора T1 плазмиди *Agrobacterium tumefaciens*, які присутні у багатьох відомих вирощуваних у промислових масштабах генетично модифікованих рослинах. Наявність позитивної динаміки для однієї або обох реакцій свідчить про наявність у зразку ДНК ГМО. Третя реакція – реакція внутрішнього позитивного контролю (ВПК) – дає змогу виключити помилково негативні результати.

Проходження кожної з трьох реакцій детектується за допомогою специфічного зонда, який мічений заданим флуоресцентним барвником. Програма дає змогу контролювати хід реакції у всіх пробірках одночасно. Після отримання достатніх даних було побудовано реальні графіки інтенсивності флуоресценції усіх пробірок для обраного барвника. При інтерпретації результатів завдяки програмному забезпеченню компанії «Синтол» дані з приладу АНК виводили на екран ПК у вигляді таблиці.

Результати й обговорення. Провівши порівняльну оцінку модифікованих високоефективних методик виділення ДНК з використанням іонного детергенту СТАВШИ (цетілтриметіламоніум броміду), а також з використанням сорбенту Silica (SiO₂), встановили що розроблені методики дозволяють отримувати вільну від тиск нто домішок і в необхідних кількостях ДНК з різних продуктів, що містять компоненти тваринного і рослинного походження. ДНК придатна для якісного та кількісного аналізу. Методики можуть використовуватися для екстракції та очищення ДНК як в багатокомпонентних, так і однокомпонентних сумішках.

Проведено дослідження з удосконалення методик визначення ГМО на основі ПЛР у реальному часі, що включають виділення ДНК з використанням сорбенту Silica (SiO₂) або використання іонного детергенту СТАВШИ (цетілтриметіламоніум броміду), ампліфікації ДНК з міченими ДНК-зондами (що представляють собою олігонуклеотид, несучий флуоресцентний барвник і флуоресцентний погашувач), використовувани для якісної і кількісної оцінки продукту.

Розроблено модифіковану методику якісного виявлення ГМО з використанням 35S промотора, NOS термінатора і внутрішнього позитивного контролю в одній реакційній суміші, що включає прискорену тиск нтозами с та оцінку результатів на основі ПЛР у реальному часі.

Показано високу чутливість і специфічність модифікованих якісних методик визначення ГМО на основі ПЛР у реальному часі (сої Roundup Ready лінії GTS 40-3-2, кукурудзи лінії MON 810), що дозволяють виявляти в зразку

ГМО менше 0,1% як в сировині, так і в продуктах харчування, в тому числі термооброблених. Час аналізу скорочується в 1,5-2 рази.

В ході проведених досліджень за 5 місяців 2013 року проведено дослідження 130 проб комбікормів (для птиці, бройлерів, свиней, телят, ВРХ та ти.), БМВД, макухи соєвої. З них було виявлено 52 позитивні проби.

Висновок: отже, ефективність методу ПЛР, як і інших методів аналізу ДНК, залежить від якості підготовленої проби, добре проведеної екстракції та чистоти виділеної ДНК.

Література

1. Попова М.Ю., Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Жаринов А.И., Рогов И.А., Скрыбин К.Г. / Определение содержания и выделение ПЦР-пригодной ДНК из коммерческих препаратов переработки сои // Биотехнология, Москва, 2003, № 2, с. 86-94.

2. Ивановцев О.В., Светличкик В.В., Каверин А.В. / Идентификация трансгенной сои в продуктах и кормах.// Журнал «Ветеринария и кормление», Москва 2006, №6 стр. 21-22

3. Назар Б.І. Актуальні питання контролю та обігу ГМО в Україні. // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Збірник наукових праць Випуск 24, Частина 2, “Ветеринарні науки” Харків 2012, ти.389- 392

Summary

B. I. Nazar (bobnaz@ukr.net)

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives

DETERMINATION METHODS OF GENETICALLY MODIFIED OBJECTS AND THEIR APPLICATION IN UKRAINE

Conducted monitoring research of products using developed methods, showed possibility of theirs using for screening and quantitative tests for determination of non-avowed GMOs in products of plant origin.

Рецензент – к.вет.н., доцент Тибінка А.М.