

ОБЛАП Р.В., канд. біол. наук

НОВАК Н.Б., канд. с.-г. наук

СЕМЕНОВИЧ В.К.

ДП «Укрметртестстандарт», м. Київ

ДИМАНЬ Т.М., д-р с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

РОЗРОБЛЕННЯ ДІАГНОСТИЧНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ЯКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГМО У ПРОДОВОЛЬЧІЙ СИРОВИНІ І ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

Розроблено тест-систему для якісного визначення генетично модифікованих організмів у продовольчій сировині і харчових продуктах методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Система уможливила ідентифікацію більшості генетично модифікованих рослин за регуляторними послідовностями промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (35S CaMV) та термінатора нопалінсинтази (NOS) з *Agrobacterium tumefaciens*. Тест-систему адаптовано під більшість приладів (Bio-Rad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технологія), якими обладнано діагностичні лабораторії України.

Ключові слова: генетично модифіковані організми, полімеразна ланцюгова реакція, промотор, термінатор, продовольча сировина, харчові продукти.

Постановка проблеми. За даними Міжнародної служби з комерційного застосування агробіотехнологічних культур (ISAAA), починаючи з 1996 року, в світі щорічно в середньому на 9 млн га збільшуються посівні площі під генетично модифіковані рослини. У 2011 році в 29 країнах такі культури вирощували більш ніж на 160 млн га, що відповідає 10 % придатної орної землі в світі [1]. У зв'язку з невинним поширенням генетично модифікованої (ГМ) продукції у світі постає нагальна проблема в оцінюванні її безпеки і якості, розробленні методологічних засад її ідентифікації.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. У країнах ЄС і Росії розроблено нормативну базу, яка регламентує контроль над поширенням генетично модифікованих організмів. Вона включає оцінювання безпеки і реєстрацію ліній трансгенних рослин, а також пост-реєстраційний моніторинг харчових продуктів на вміст генетично модифікованих організмів (ГМО) [2-3]. Моніторинг спрямований передусім на те, щоб не допустити до споживача ГМО, не зареєстрованих у реєстрі дозволених для використання. Крім того, виходячи із принципу обережності, пост-реєстраційний моніторинг контролює правильність маркування продукції, яка містить ГМО, з метою інформування споживача і надання можливості вибору під час придбання продуктів. В Україні така нормативна база наразі створюється.

Для проведення моніторингу продовольчої сировини та харчової продукції на вміст ГМО надзвичайно важливим є розроблення високоефективних методик для їх визначення. Незважаючи на досягнуті у цьому напрямі значні успіхи, актуальним є удосконалення методів у сенсі експресності, оптимізації пробопідготовки, валідації з конкретними об'єктами і приладами, а також апробація різних модифікацій і визначення їх місця у системі скринінгового чи кількісного аналізу.

Метою роботи було розроблення вітчизняної тест-системи для визначення наявності ГМО рослинного походження у продовольчій сировині і харчових продуктах.

Матеріали і методика досліджень. Дослідження проводили у лабораторії молекулярно-генетичних досліджень науково-дослідного центру випробувань продукції ДП «Укрметртестстандарт», яка акредитована Національним агентством акредитації України на компетентність відповідно до вимог ДСТУ ISO / ІЕС 17025-21.

Матеріалом для виділення геномної ДНК слугували стандартні референтні зразки сої та кукурудзи [4], які являли собою суміш борошна рослини дикого типу (0 % ГМО) та генетично модифікованої (ГМ) рослини (100 % ГМО) у певному процентному співвідношенні.

ДНК виділяли методом СТАБ-преципітації з власними модифікаціями. Концентрацію та чистоту виділеної нуклеїнової кислоти визначали на спектрофотометрі «BioPhotometer» (Eppendorf, Германия) за довжини хвилі $\lambda=260$ нм.

ПЛР-ампліфікацію в режимі реального часу проводили за допомогою приладів iQCyler та CFX96 (BioRad). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 2 мкл ДНК, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ суміші, 5 пкМ кожного з праймерів, 2,5 пкМ зонду та 1 од. Taq-полімерази (Fermentas, Литва).

Використовували олігонуклеотидні зонди BHQ1 та BHQ2, мічені флуоресцентними барвниками FAM, JOE, ROX та гасниками флуоресценції.

Температурний режим складався з початкової денатурації упродовж 3 хв за 95 °С та наступних 45 циклів: денатурації – 15 с за 95 °С, відпалу праймерів та синтезу – 40 с за 60 °С. Флуоресцентний сигнал вимірювали по закінченні стадії відпалу праймерів та синтезу у кожному циклі ампліфікації. Пороговим (Ct) для кожного зразка визначали цикл, за якого кінетична крива флуоресценції перетинала порогову лінію. Базову лінію, що являє собою фоновий рівень флуоресценції, автоматично визначало програмне забезпечення приладу. Пробу розглядали як позитивну на наявність ГМО, якщо сигнал флуоресценції детектувався за каналами FAM чи ROX або FAM/ROX одночасно. Відповідно, зразок розглядали як негативний на вміст ГМО, якщо за зазначеними каналами флуоресценція була відсутньою. Наявність сигналу ендogenous контролю детектувалась за каналом JOE, що свідчило про коректне проведення усіх стадій аналізу та відсутність інгібування ферментативної реакції у зразку. Якщо сигнал за каналом JOE був відсутнім, проводили повторне дослідження даного зразка зі стадії виділення ДНК.

Для проведення абсолютного кількісного аналізу з метою визначення межі чутливості розробленої нами ПЛР-системи були отримані абсолютні стандарти, які являли собою плазмідну ДНК (pGEM-T) з клонованими ПЛР-фрагментами генів лектину сої (Lec), алкогольдегідрогенази (Adh1) кукурудзи, послідовності промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (35S CaMV) та термінатора нопалінсинтази (NOS) з *Agrobacterium tumefaciens*. Розрахунок кількості копій проводили за формулою:

$$(X / [N \times 660]) \times Y = Z,$$

де X – концентрація плазмідної ДНК у г/мкл; N – розмір плазмідної ДНК у парах нуклеотидів; Y – число Авогадро (6,022 × 10²³); Z – число копій молекули плазмідної ДНК у мкл [5].

Результати досліджень та їх обговорення. Під час розроблення ПЛР-системи для визначення ГМО у режимі реального часу ми використали технологію *TaqMan* [6]. Для виготовлення тест-систем використовували реагенти фірм “Sigma”, “Fluka”, “Fermentas” та “Синтол”.

Для молекулярної діагностики ГМО рослинного походження нами було підібрано і синтезовано специфічні олігонуклеотидні праймери і зонди до найбільш поширених нині елементів генно-інженерних конструкцій – промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (35S CaMV) та термінатора нопалінсинтази (NOS) з *Agrobacterium tumefaciens*.

Для перевірки якості виділення геномної ДНК та контролю перебігу ПЛР нами було введено ендogenous видоспецифічний контроль. Таким контролем слугували гени лектину (*Lec*) соєвих бобів та алкогольдегідрогенази (*Adh1*) кукурудзи.

Тест-систему для якісного визначення ГМО було розроблено в двох виконаннях: «ГМО соя (35S/NOS скринінг)» та «ГМО кукурудза (35S/NOS скринінг)». Особливістю цієї системи є те, що в одній пробірці відбуваються три незалежні реакції. Одна реакція уможливорює виявлення фрагмента ДНК 35S промотора CaMV, який присутній у переважній більшості відомих і вирощуваних у промислових масштабах ГМ рослинах. Інша реакція дає змогу виявити фрагмент ДНК NOS-термінатора, який також присутній у багатьох промислово вирощуваних ГМ рослинах. Наявність позитивної динаміки для однієї або обох реакцій свідчить про наявність у зразку ДНК ГМ рослини. Третя реакція – реакція внутрішнього позитивного контролю (ВПК), який дає змогу вилучити хибно-негативні результати. Для сої ВПК є фрагмент гена *Lec*, кукурудзи – *Adh1*. Перебіг кожної з трьох реакцій детектується за допомогою специфічного зонда, міченого заданим флуоресцентним барвником. Для виявлення 35S промотора використовують зонд, мічений барвником FAM, для NOS-термінатора – барвником ROX, а для ВПК – барвником JOE.

Оптимізацію умов ампліфікації проводили за трьома основними параметрами: температурою відпалу праймерів, концентрацією праймерів і зондів та концентрацією MgCl₂. Підбір оптимальних умов відпалу показав, що обрані нами праймери можуть ефективно працювати в діапазоні

температур від 58 до 62 °C без істотних змін у значеннях St (величина порогового циклу) і ΔRn (нормований сигнал репортерного барвника). Із чотирьох обраних концентрацій $MgCl_2$ (1,5; 2; 2,5 та 3 мМ) найкращі результати було отримано за концентрації 2,5 мМ. Цьому значенню концентрації відповідало найменше значення St – 28,39–30,18 і найбільше значення ΔRn – 900–1700 для всіх трьох барвників.

Далі проводили оптимізацію співвідношення концентрацій праймерів і зондів, що дало змогу визначити мінімальну концентрацію праймера, за якої спостерігається мінімальна величина St і максимальне значення ΔRn за постійної концентрації матриці-мішені. Серія реакцій з різними комбінаціями концентрацій праймерів і зондів у межах від 2,5 до 10 пкМ уможливила досягнення оптимальної ефективності аналізу. Оптимальне значення концентрації становило 5 пкМ для праймерів та 2,5 пкМ для зондів.

У процесі розроблення тест-системи велику увагу приділяли оцінюванню її ефективності, тобто аналітичним характеристикам – специфічності, чутливості, межі детектування, повторюваності та відтворюваності результатів аналізу, що проводилось відповідно до вимог Об'єднаного Центру досліджень ГМО (JRC) Європейського Союзу, встановлених до подібних розробок. Оцінювання ефективності роботи тест-системи проводили з використанням сертифікованих референтних зразків, розроблених Бельгійським Інститутом контрольних матеріалів і методів (Institute for Reference Materials and Methods).

Наступним етапом роботи було визначення межі чутливості розробленої системи. Для приготування абсолютних стандартів було проведено серію розведень плазмідної ДНК. Отримані розведення містили 10^9 , 10^8 , 10^6 , 10^3 , 10^2 і 10^1 копій плазмідної ДНК. На підставі отриманих результатів було встановлено, що межа чутливості цього методу для 35S-промотора, NOS-термінатора та ендегенних контролів становить близько 20 копій ДНК-мішені. Отримані результати відповідають вимогам ДСТУ ISO 21570:2008 [7].

Незалежно від того, які критерії дизайну праймерів було використано, специфічність їхньої роботи необхідно перевіряти експериментально для того, щоб підтвердити здатність праймерів вирізняти цільову послідовність серед близьких до неї нецільових послідовностей. Для оцінювання специфічності розробленої системи було використано стандартні референтні зразки (CRM, IRMM) ГМ сої та кукурудзи, а також зразки комерційної харчової продукції. В таблиці 1 наведено дані щодо експериментального визначення специфічності.

З метою забезпечення стабільності результатів розроблені тест-системи комплектуються наборами готових реагентів для кожного етапу аналізу і контрольними зразками, які дають змогу уникнути помилок під час аналізу результатів. Використана в тест-системах методика екстракції ДНК забезпечує високий вихід рослинної ДНК із продуктів, які пройшли термічну обробку, і видалення усіх інгібіторів ПЛР, тим самим сприяючи добрій відтворюваності результатів аналізу.

Висновки. Таким чином, нами було розроблено вітчизняну діагностичну тест-систему на основі методу ПЛР у режимі реального часу, яка дає змогу проводити аналіз продовольчої сировини і харчових продуктів на наявність ГМО рослинного походження. Розроблена тест-система за своїми характеристиками відповідає всім вимогам міжнародних стандартів щодо проведення ПЛР-аналізу для визначення якісного вмісту ГМО в харчових продуктах та продовольчій сировині.

Тест-систему адаптовано під більшість приладів (Bio-Rad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технологія), якими обладнано діагностичні лабораторії України.

Розроблена тест-система значно дешевша порівняно з тест-системами, присутніми нині на українському ринку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/default.asp>, офіційний сайт міжнародної служби з комерційного застосування агробіотехнологічних культур (ISAAA).
2. James C. Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops: 2009. ISAAA Brief N 41. –Ithaka. –New York: ISAAA, 2009. – 37 p.
3. <http://www.biodiv.org/biosafety/>, офіційний сайт Картахенського протокола о біобезопасности: международный документ, регулирующий торговлю генетически модифицированными организмами и оценку их влияния на биоразнообразие и здоровье людей.
4. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Якісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти / ДСТУ ISO 21569:2008. – Київ: Держспоживстандарт України. – 2009. – 48 с.

5. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Екстрагування нуклеїнової кислоти. / ДСТУ ISO 21571:2008. – Київ: Держспоживстандарт України. – 2009. – 31 с.

6. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др.; под редакцией Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2009. – 223 с.

7. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Кількісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти. / ДСТУ ISO 21570:2008. – Київ: Держспоживстандарт України. – 2009. – 70 с.

Разработка диагностической тест-системы для качественного определения ГМО в продовольственном сырье и пищевых продуктах

Р.В. Облап, Н.Б. Новак, В.К. Семенович, Т.Н. Дымань

Разработана тест-система для качественного определения генетически модифицированных организмов в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Система позволяет идентифицировать большинство модифицированных растений по регуляторным последовательностям промотора вируса мозаики цветной капусты (35S CaMV) и терминатора нопалинсинтазы (NOS) с *Agrobacterium tumefaciens*. Тест-систему адаптировано под большинство приборов (Bio-Rad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технология), которыми оборудованы диагностические лаборатории Украины.

Ключевые слова: генетически модифицированные организмы, полимеразная цепная реакция, промотор, терминатор, продовольственное сырье, пищевые продукты.

Development of diagnostic test-system for qualitative detection of genetically modified organisms in raw material and foodstuffs

R. Oblap, N. Novak, V. Semenovich, T. Dyman

The test-system for the qualitative detection of genetically modified organisms in raw material and foodstuffs by polymerase chain reaction in real time was developed. The system enables the identification of most genetically modified plants for regulatory sequences, promotor of cauliflower mosaic virus (35S CaMV) and terminator nopaline synthase (NOS) from *Agrobacterium tumefaciens*. Test system adapted for most devices (Bio-Rad, Applied Biosystems, Corbett Research, Syntol, DNA Technology) using by Ukraine diagnostic laboratories.

Key words: genetically modified organisms, polymerase chain reaction, promotor, terminator, raw material, foodstuffs.