УДК 577.2:575:57.
08:658.562
© 2012

Р.В. Облап,
кандидат біологічних наук
ДП «Укрметртест-стандарт»

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ СОЇ ТА КУКУРУДЗИ МЕТОДОМ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Розроблено тест-систему для кількісного визначення генетично модифікованих сої та кукурудзи у продовольчій сировині і харчових продуктах методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Система уможливлює кількісну оцінку однокомпонентних сумішей генетично модифікованих рослин за регуляторними послідовностями промотору 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.

Із застосуванням біотехнологічних методів у сільському господарстві та аграрній промисловості з'явилися нові можливості для виробництва більш якісних продуктів харчування, кормів та енергетичних культур для задоволення потреб населення, які постійно зростають. Проте думки експертів щодо переваг та ризиків генної інженерії різняться, передусім через непередбачені довготривалі наслідки та ризики для людей і навколишнього середовища.

У країнах ЄС та Росії розроблено нормативну базу, яка регламентує контроль за поширенням генетично модифікованих організмів (ГМО). Вона передбачає оцінювання безпеки, реєстрацію ліній трансгенних рослин та пост-реєстраційний моніторинг харчових продуктів на вміст ГМО [5–7].

На основі законодавчої бази України, зокрема ст. 50 Конституції України, ст. 15 Закону України «Про захист прав споживачів» та ст. 38 Закону України «Про безпечність та якість харчових продуктів в Україні» запроваджено обов'язкове маркування харчових продуктів щодо наявності чи відсутності у них ГМО.

З метою проведення моніторингу продовольчої сировини та харчової продукції на вміст ГМО надзвичайно важливим є розроблення високоефективних методик для їх визначення. Попри досягнуті в цьому напрямі успіхи актуальними залишаються питання оптимізації пробопідготовки зразків, валідації з конкретними об'єктами і приладами, а також апробації різних модифікацій у системах скринінгового та кількісного аналізу.

Мета роботи — розроблення вітчизняної тест-системи для кількісного визначення вмісту ГМО рослинного походження в продовольчій сировині та харчових продуктах.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження здійснювали у науково-виробничій лабораторії молекулярно-генетичних досліджень науково-дослідного центру випробувань продукції ДП «Укрметртестстандарт», акредитованій Національним агентством акредитації України на компетентність відповідно до вимог ДСТУ ISO/IEC 17025-21.

Матеріалом для виділення геномної ДНК були стандартні референтні зразки сої та кукурудзи [1], які являли собою суміш борошна рослини дикого типу (0% ГМО) та генетично модифікованої рослини (100% ГМО) в певному відсотковому співвідношенні.

ДНК виокремлювали методом СТАБ-преципітації з власними модифікаціями. Концентрацію та чистоту виокремленої нуклеїнової кислоти визначали на спектрофотометрі «BioPhotometer» (Eppendorf, Німеччина) за довжини хвилі λ=260 нм.

ПЛР-ампліфікацію в режимі реального часу здійснювали за допомогою приладів iQCycler та CFX96 (BioRad). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 100 нг ДНК, 10 мМ Тріс-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ дНТФ суміші, 5 пкМ кожного з праймерів, 2,5 пкМ зонда та 1 од. Tag-полімерази (Fermentas, Литва).

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

Температурний режим складався з початкової денатурації впродовж 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 після закінчення стадії відпалу праймерів та синтезу в кожному циклі ампліфікації. Пороговим (Ст) для кожного зразка визначали цикл, за якого кінетична крива флуоресценції перетинала порогову лінію. Базову лінію, що є фоновим рівнем 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 флуоресценції не було. Наявність сигналу ендогенного контролю детектувалася за каналом JOE, що свідчило про коректне проведення всіх стадій аналізу та відсутність інгібування ферментативної реакції у зразку. Якщо сигналу за каналом JOE не було, повторно досліджували цей зразок, починаючи зі стадії виділення ДНК.

Для проведення абсолютного кількісного аналізу з метою визначення межі чутливості розробленої нами ПЛР-системи було отримано абсолютні стандарти, які являли собою плазмідну ДНК (pGEM-T) з клонованими ПЛР-фрагментами генів лектину (Lec) сої, алкогольдегідрогенази (Adh1) кукурудзи, послідовності промотору (p35S CaMV) вірусу мозаїки цвітної капусти та термінатора нопалінсинтази (tNOS) з *Agrobacterium tumefaciens.* Кількість копій розраховували за формулою: $(X/[N\times660])\times V = Z$, де X — концентрація плазмідної ДНК у г/мкл; N — розмір плазмідної ДНК у парах нуклеотидів; Y — число Авогадро ($6{,}022\times10^{23}$); Z — кількість копій молекули плазмідної ДНК у мкл [2, 4].

Результати досліджень. У розробленні ПЛР-системи для визначення ГМО в режимі реального часу використано технологію *TagMan* [4]. У виготовленні тест-систем застосовували реагенти фірм «Sigma», «Fluka», «Fermentas» та «Синтол».

Для молекулярної діагностики ГМО рослинного походження було підібрано і синтезовано специфічні олігонуклеотидні праймери та зонди до найпоширеніших нині елементів генноінженерних конструкцій — промотору 35S CaMV та термінатора NOS.

Для перевірки якості виділення геномної ДНК та контролю за перебігом ПЛР було введено ендогенний видоспецифічний контроль. Таким контролем були гени *Lec* соєвих бобів та *Adh1* кукурудзи.

Тест-систему для кількісного визначення ГМО розроблено у 2-х виконаннях: «ГМО соя (кількість)» та «ГМО кукурудза (кількість)». Особливістю цієї системи є те, що в одній пробірці відбуваються 3 незалежні реакції. Одна реакція уможливлює виявлення фрагмента ДНК p35S CaMV, наявного в переважній більшості відомих і вирощуваних у промислових масштабах ГМ рослинах. Друга реакція дає змогу виявити фрагмент ДНК tNOS, який також є в багатьох 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), що дає змогу вилучити хибно негативні результати. Для сої ВПК є фрагмент гена *Lec,* кукурудзи — *Adhl.* Перебіг кожної з 3-х реакцій детектують за допомогою специфічного зонда, міченого заданим флуоресцентним барвником. Для виявлення p35S CaMV використовували зонд, мічений барвником FAM, для tNOS — барвником ROX, для ВПК — барвником JOE.

У процесі розроблення тест-системи значну увагу приділяли оцінюванню її ефективності, тобто аналітичним характеристикам — специфічності, чутливості, межі детектування, повторюваності та відтворюваності результатів аналізу, що здійснювали відповідно до вимог Об'єднаного Центру досліджень ГМО (JRC) Європейського Союзу, установлених до таких розробок. Ефективність роботи тест-системи оцінювали з використанням сертифікованих референтних зразків, розроблених бельгійським Інститутом контрольних матеріалів і методів (Institute for Reference Materials and Methods).

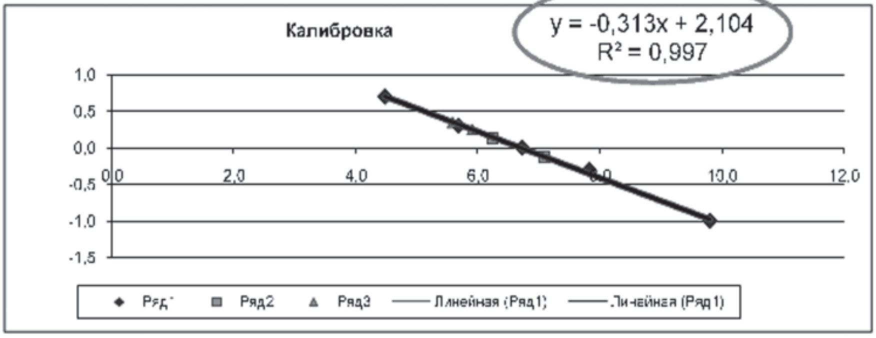
Оптимізацію умов ампліфікації здійснювали за 3-ма основними параметрами: температурою відпалу праймерів, концентрацією праймерів і зондів та концентрацією $MgCl_2$. Підбір оптимальних умов відпалу показав, що обрані нами праймери можуть ефективно працювати в діапазоні температур 58–62°С без істотних змін у значеннях Ст (величина порогового циклу) і ΔRn (нормований сигнал репортерного барвника). Із 4-х 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 Ст — 28,39–30,18 і найбільше значення ΔRn — 900–1700 для всіх 3-х барвників.

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

№	Название	%	log %	Lec/Adh	p35S	Разница	Среднее	% итог	ст откл	
1	стандарт	0,1	-1	26,14	35,70	9,56	9,802			
2	стандарт	0,1	-1	26,01	36,06	10,05				
1	стандарт	0,5	-0,301	26,01	33,81	7,79	7,822			
2	стандарт	0,5	-0,301	26,23	34,08	7,85				
3	стандарт	1	0	25,82	32,48	6,65	6,719			
4	стандарт	1	0	25,73	32,51	6,79				
5	стандарт	2	0,301	25,82	31,48	5,65	5,671			
6	стандарт	2	0,301	25,61	31,30	5,69				
7	стандарт	5	0,699	25,60	30,19	4,59	4,468			
8	стандарт	5	0,699	25,56	29,90	4,34				
9	ПКО-1.0%	1,401	0,146	26,05	32,29	6,24		1,08	0,45	U (k=2)
10	ПКО-1.0%	0,765	-0,117	26,11	33,19	7,08				soy
11	ГМ соя	2,271	0,356	25,68	31,25	5,57		2,04	0,33	0,41
12	ГМ соя	1,808	0,257	25,13	31,01	5,88				
13		######	2,104			0,00			0,00	0,00
14		######	2,104			0,00				
15		######	2,104			0,00			0,00	0,00

Уравнение калибровочной кривой: ГМО соя/кукуруза (35S+ген растения)

Y = -0,3139 *X + 2,1043



Приклад розрахунку кількісного вмісту ГМО в досліджуваних зразках з використанням документа Microsoft Excel «Шаблон ГМО кількість»

становило 5 пкМ для праймерів та 2,5 пкМ — зондів.

Наступний етап роботи — 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. За результатами досліджень було встановлено, що межа чутливості цього методу для p35S CaMУ, tNOS та ендогенних контролів становить близько 20 копій ДНК-мішені. Отримані результати відповідали вимогам ДСТУ ISO 21570:2008 [3].

Незалежно від того, які критерії дизайну праймерів було використано, специфічність їхньої роботи слід перевіряти експериментально для того, щоб підтвердити здатність праймерів вирізняти цільову послідовність серед близьких до неї нецільових послідовностей. Для оцінювання специфічності розробленої системи застосовано стандартні референтні зразки (CRM, IRMM) ГМ сої і ГМ кукурудзи та зразки комерційної харчової продукції.

Кількісне визначення ГМО рослинного походження засноване на розрахунку співвідношення кількості ДНК певної лінії ГМ рослини і загальної кількості ДНК аналізованої рослини, вираженого у відсотках. Для кількісного визначення ГМО одночасно здійснюють 2 незалежні реакції в одній пробірці. Одна реакція дає змогу виявити ДНК аналізованої рослини (соя або кукурудза), інша — послідовність, специфічну для генно-інженерного конструкта (p35S CaMV або tNOS). Визначення відсоткового вмісту ГМО відбувається з використанням 5-ти стандартних зразків, які являють собою суміші борошна рос-

лини дикого типу та ГМ рослини в певному відсотковому співвідношенні (0,1; 0,5; 1; 2 та 5%). Різницю значень граничних циклів 2-х реакцій для стандартних зразків використовують з метою побудови калібрувальної прямої, за допомогою якої розраховують відсотковий уміст ДНК ГМО в аналізованих зразках (рисунок).

Калібрувальний графік характеризують такі статистичні дані, як кут нахилу прямої (відповідає ефективності реакції ампліфікації) та значення коефіцієнта кореляції R^2. За цими параметрами оцінюють якість результатів кількісного аналізу. За 100%-ї ефективності реакції ампліфікації кут нахилу дорівнює –3,33. Припустимі значення коефіцієнта кореляції перебувають в інтервалі $1>R^2>0,95$.

Результати аналізу зразків приймають, якщо коефіцієнт кореляції калібрувальної кривої побудовано за сертифікованими стандартними зразками, за методом найменших квадратів $R^2>0,97$. Межі інтервалу, в якому похибка визначення перебуває з довірчою ймовірністю P=0,95, становлять 0,1–5%. Нижню й верхню межі похибки визначають за доступними сертифікованими контрольними зразками, а стандартні відхилення повторюваності результатів (d) становлять від 0,067 (для стандарту 0,1%) до 0,540 (для стандарту 5%), що відповідає похибці сертифікованих контрольних зразків.

З метою забезпечення стабільності результатів розроблені тест-системи комплектують 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 з продуктів, які пройшли термічну обробку, і видалення всіх інгібіторів ПЛР, що сприяє належній відтворюваності результатів аналізу.

Висновки

На основі методу ПЛР у режимі реального часу розроблено вітчизняну діагностичну тест-систему, яка дає змогу здійснити кількісний аналіз продовольчої сировини і харчових продуктів на наявність ГМО рослинного походження. Ця тест-система за своїми характеристиками відповідає всім вимогам міжнародних стандартів щодо проведення ПЛР-аналізу для визначення вмісту ГМО.

Тест-систему адаптовано під більшість приладів (Bio-Rad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технологія), якими обладнано діагностичні лабораторії України. Розроблена тест-система є значно дешевшою порівняно з тест-системами, наявними нині на українському ринку.

Бібліографія

1. *Методи* виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Якісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти/ДСТУ ISO 21569:2008. — К.: Держспоживстандарт України, 2009. — 48 с.

2. *Методи* виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Екстрагування нуклеїнової кислоти/ДСТУ ISO 21571:2008. — К.: Держспоживстандарт України, 2009. — 31с.

3. *Методи* виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Кількісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти/ДСТУ ISO 21570:2008. — К.: Держспоживстандарт України, 2009. — 70 с.

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

5. *James C.* Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief. — № 41. — Ithaka. — New York: ISAAA, 2009. — 37 p.

6. http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/default.asp, офіційний сайт міжнародної служби з комерційного застосування агробіотехнологічних культур (ISAAA).

7. http://www.biodiv.org/biosafety, официальный сайт Картахенского протокола о биобезопасности: международный документ, регулирующий торговлю генетически модифицированными организмами и оценку их влияния на биоразнообразие и здоровье людей.