

УДК 619: 614.31: 608.34: 663/664

З. С. МІСЬКЕВИЧ, магістрант ветеринарної медицини

С. В. МІСЬКЕВИЧ, кандидат ветеринарних наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

РЕЗУЛЬТАТИ ПОРІВНЯННЯ ДЕЯКИХ МЕТОДІВ ІНДИКАЦІЇ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ КОМПОНЕНТІВ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ ТА СИРОВИНІ

У статті наведено результати порівняльного вивчення деяких методів індикації та ідентифікації генетично модифікованих компонентів у харчових продуктах та сировині, які використовуються в Україні.

Ключові слова: генетично модифіковані організми, дезоксирибонуклеїнова кислота, імуно-ферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція, трансгенні харчові продукти.

Після виявлення у 1996 році в Європі генетично модифікованої сої і введення вимог маркування з'явилася потреба в розробці відповідних засобів і методів її контролю, що розширювало можливості міжнародної торгівлі. З цією метою були запропоновані чутливі методи ідентифікації генетично модифікованих інгредієнтів (ГМІ) у харчових продуктах, які полягають в пошуку модифікованих послідовностей дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) і (або) нових білків (протеїнів), отриманих в результаті генетичних модифікацій. Відправна точка – стратегія здійснення вибірки, яка підходить для отримання зразка досліджуваної продукції. Наступний крок – екстракція протеїну, або ДНК із зразка, що вивчається. Екстракт протеїну піддається аналізу методами імунохімії та якісної або кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [1,4,7].

Методи виявлення генетично модифікованих організмів (ГМО) були розроблені для того, щоб дати можливість зацікавленим сторонам, таким як насінева промисловість, виробники зернових культур, харчових продуктів і аналітичні лабораторії дотримуватись вимог до маркування і дозволити контролюючим органам за якістю харчових продуктів підтверджувати їх відповідність законодавчим вимогам.

Після пропозиції від Німеччини, яка першою в 1997 році запропонувала офіційний метод виявлення ГМО, технічний комітет з аналізу харчових продуктів Європейського комітету зі стандартизації (CEN) вирішив у червні 1998 року заснувати робочу групу для розроблення стандартів на виявлення генетично змінених організмів і отриманих харчових продуктів [7]. Її члени представляють науку, харчову промисловість, аналітичні лабораторії та органи з контролю харчових продуктів. Проекти цих методів були опубліковані як стандарти EN ISO:

- Методи, що базуються на протеїні (EN ISO 1572:2004 AC:2005);
- Методи екстракції нуклеїнових кислот (EN ISO 21571: 2005);

– Методи, що базуються на кількості нуклеїнової кислоти (EN ISO 21569: 2005).

Як кількісний тест найбільш технологічним є, безумовно, метод ПЛР в реальному часі, яку проводять з міченими флуоресцентною міткою праймерами. Цей метод дозволяє визначити продукти реакції безпосередньо на протязі ампліфікації без подальшого електрофорезу. Проводячи діагностику на окремих приладах, можна одночасно виявляти декілька агентів в одній пробі. Обладнання для ПЛР в реальному часі автоматизоване, компактне, просте в експлуатації і не потребує окремої чистої кімнати.

А. М. Смирнов та ін. [4] повідомляють про ефективне використання для визначення ГМІ в харчових продуктах, крім ПЛР ДНК, мікрочіпової технології, аналізу нуклеотидних послідовностей, ампліфікацію генів з подальшою ДНК – гібридизацією та імуноферментний аналіз.

Е. Ю.Сорокіна та ін.[5], Ф. А. Чміленко[6] довели можливість визначення ГМО в продуктах харчування методом газової хроматографії та імуноферментними методами, Г. В. Козлова – методами лазерної спектроскопії [2], Kim Yun – Jeong та ін. – методом капілярного гелелектрофореза в мікрочіпі [8]. Вони досить чутливі, дають можливість виявляти зміни хімічного складу продукту, однак вимагають наявності дуже дорогого обладнання і висококваліфікованих спеціалістів.

На думку Ю. М. Новожицької та О. С. Гайдай [3], основними методами виявлення ГМО в рослинній сировині та харчових продуктах є імуноферментний аналіз (ІФА) та аналіз ДНК рослин (ПЛР в реальному часі, гібридизаційний аналіз).

Метою нашої роботи було порівняння чутливості, специфічності та адекватності деяких методів виявлення, ідентифікації й кількісного аналізу ДНК-ГМО, які використовуються в Україні.

Матеріали і методи дослідження. Експерименти проводили на базі лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт». Матеріалами для дослідження були харчові продукти та сировина, що вироблюється в Україні та імпортовані з США, Російської Федерації, Бельгії, Китаю, Аргентини, Іспанії, Італії, Нідерландів, Німеччини, Індії, зокрема кукурудза, соя, шрот соняшниковий і дитяча суміш.

Спочатку проби готували для виділення з них ДНК. Для того, щоб зразки не мали сторонніх домішок і не відбулася перехресна контамінація, їх відбирали в гумових рукавичках, одноразовими інструментами в чисті одноразові пластикові пробірки. Метод аналізу є настільки чутливим, що наявність навіть слідів перехресного забруднення може призвести до неправдивих результатів.

Відібрані зразки розподіляли на дві частини: одна зберігається в лабораторії, а другу брали для виділення ДНК. Для цього використовували дві різні методики, залежно від діагностичних наборів для виділення ДНК і тест – систем. У першому випадку це був набір для виділення ДНК «ДНК–сорб–Б, «ИнтерЛабСервис», Росія», а у другому – набір для виділення ДНК «AccuPrep GMO DNA Extraction Kit», „BIONEER”, Південна Корея.

Головною відмінністю двох застосованих нами методів виділення ДНК є те, що на стадії відмивання і преципітації використовуються різні процедури: в першому випадку відмивання ДНК відбувається за допомогою сорбенту у вигляді емульсії, а в другому для цього використовуються колонки з нанесеним шаром сорбенту, які поміщаються в пробірки. Крім того, маса лізуючого розчину та протеїнази К, що вносяться на першій стадії виділення також не значно, але відрізняється (при першому методі – 300 мкл лізуючого розчину і 15 мкл протеїнази К, а при другому – 400 мкл буфера для лізиса і 20 мкл протеїнази К). Основні відмінні ознаки двох випробуваних нами методик виділення ДНК представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика методик виділення ДНК

Показники	МЕТОДИКИ	
	Методика 1 (набір для виділення ДНК «ДНК – сорб Б», «ИнтерЛабСервис», Росія)	Методика 2 (Набір для виділення ДНК «AccuPrep GMO DNA Extraction Kit», „BIONEER”, Південна Корея)
Маса наважки (мг)	50 -100	100 - 200
Маса лізуючого розчину (мкл)	300	400
Маса протеїнази К (мкл)	15	20
Тип очистки ДНК	Сорбент - емульсія	Колонки з шаром сорбенту
Температура інкубування °С	65	60
Час проведення виділення (год.)	2,5	2,0
Вартість набору для виділення ДНК (грн.)	1,000	2,024

Отримані за двома методиками розчини ДНК використовували в полімеразній ланцюговій реакції в режимі реального часу для ідентифікації та кількісного визначення вмісту ГМО. Її постановка дає можливість не тільки визначити вихід продукту реакції після кожного циклу ампліфікації, але й конструювати згідно з отриманими даними кінетичну криву ПЛР і на її основі визначати відносну концентрацію субстрату.

Результати досліджень. Як видно з табл.1, методика виділення ДНК із застосуванням набору південнокорейської фірми „BIONEER”, у порівнянні із російським набором, більш вартісна, вимагає більшої наважки (до 200 мг), маси лізуючого розчину (на 100 мкл) та протеїнази (на 5 мкл). В той же час вона потребує менше часу для виділення ДНК (на 50 хвилин) і нижчої температури інкубування (+60°С).

Результати експериментальних досліджень засвідчили, що методика №2 дає можливість отримати більш точні й адекватні результати наявності ГМО компонентів, оскільки за допомогою набору «ДНК – сорб – Б», «ИнтерЛабСервис» (Росія) виділяється вища концентрація ДНК, але ця ДНК “брудна” за рахунок виділення ДНК і РНК не тільки рослин, але і побічних продуктів. Набір південнокорейської фірми „BIONEER” дозволяє розраховувати на вищий вихід “чистої” ДНК, що є більш достовірною інформацією про виділену ДНК – ГМО, хоча загальна концентрація виділеної за допомогою цього набору ДНК в даному випадку нижча. Найвища концентрація виділеної ДНК – ГМО зареєстрована в зразках дитячої суміші, що є небезпечним сигналом, оскільки вона використовується для харчування малюків (табл. 2).

Таблиця 2

Результати виділення ДНК – ГМО з різних продуктів

Діагностичний набір	Назва продукту	Концентрація виділеної ДНК(мг/мл)	Цикл на якому виділяється ДНК
Методика 1 (набір для виділення ДНК «ДНК – сорб – Б», «ИнтерЛабСервис», Росія)	Кукурудза	61,49	28,07
	Соя	56,78	29,08
	Шрот сояшниковий	57,82	30,05
	Дитяча суміш	65,89	28,05
Методика 2 (Набір для виділення ДНК «AccuPrep GMO DNA Extraction Kit», „BIONEER”, Південна Корея)	Кукурудза	50,89	26,04
	Соя	54,30	26,01
	Шрот сояшниковий	50,04	27,04
	Дитяча суміш	57,80	26,07

Висновки

1. Точнішим підготовчим методом виділення ДНК–ГМО з різних продуктів є використання набору ДНК «AccuPrep GMO DNA Extraction Kit», „BIONEER”, південно – корейського виробництва. Даний метод дає можливість одержати меншу кількість ДНК, але вона є більш чистою порівняно з набором «ДНК – сорб – Б», «ИнтерЛабСервис» (Росія), що виділяє ДНК не тільки рослин, але і побічних продуктів.

2. Чутливим, специфічним і точним методом виявлення ГМО в продуктах та сировині є метод полімеразно-ланцюгової реакції в режимі реального часу, який дозволяє не лише ідентифікувати, але й проводити кількісний аналіз ДНК-ГМО.

Список використаної літератури

1. Глазко В. И. Генетически модифицированные организмы: от бактерий до человека / В.И.Глазко. – К.: КВІЦ, 2002. – 210с.

2. *Козлова Г. В.* Лазерная спектроскопия модифицированных объектов: автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. физ.-мат. наук / Г.В. Козлова. – Ульяновск, 2005. – 21 с.

3. *Новожицька Ю. М.* Генетично модифіковані організми / Ю. М. Новожицька, О. С. Гайдей // Ветеринарна медицина України. – 2012. – №11(201). – С.8-9.

4. *Смирнов А. М.* Методы определения генетически модифицированных организмов / А. М. Смирнов, В. М. Писарева, Л. В. Рощупкина // Ветеринария. – 2008. – № 2. – С. 58 – 60.

5. *Сорокина Е. Ю.* Идентификация рекомбинантной ДНК в пищевой продукции: результаты мониторинга / Е. Ю. Сорокина, О. Н. Чернышева, Н. Н. Филатов // Симпозиум „Функциональное питание, пищевая безопасность и здоровье людей в условиях мегаполиса”. Москва, 2 – 3 декабря 2003: Сборник докладов, программа. – М., 2003. – С. 11 – 13.

6. *Чмиленко Ф. А.* Определение ГМО в продуктах питания. Сравнение методик выделения ДНК / Ф. А. Чмиленко, Н. П. Минаева, Л. П. Сидорова // Методы и объекты химического анализа. – 2011. – №1. – С. 28 – 37.

7. *Шозу Марианна.* Виявлення генетичної модифікації в зернових культурах і отриманих харчових продуктах / Марианна Шозу// Мясной бизнес. – 2007. – №11. – С.20-21.

8. *Kim Yun – Jeong.* Microchip capillary gel electrophoresis using programmed field strength gradients for the ultrafast analysis of genetically modified organisms in soybeans / Kim Yun – Jeong, Chae Joon – Seok, Chang Jun Keun // Journal of Chromatography A. – 2005. – 1083, № 1-2. – С. 179 –

РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ МЕТОДОВ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КОМПОНЕНТОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ / З. С. Миськевич, С. В. Миськевич

В статье приведены результаты сравнительного изучения методов индикации и идентификации генетически модифицированных компонентов у пищевых продуктах и продовольственном сырье, которые используются в Украине.

Ключевые слова: генетически модифицированные организмы, дезоксирибонуклеиновая кислота, иммуно-ферментный анализ, полимеразная цепная реакция, трансгенные пищевые продукты.

RESULTS COMPARISON OF SOME METHODS FOR DISPLAY AND IDENTIFICATION OF COMPONENTS OF GENETICALLY MODIFIED FOODS AND FOOD COMPOSITION / Z. S. Miskevich, S. V. Miskevich

The paper presents the results of a comparative study of the methods of indication and identification of genetically modified organisms in food and food raw materials that are used in Ukraine.

Keywords: genetically modified organisms, deoxyribonucleic acid, immuno-enzyme assay, polymerase chain reaction, transgenic foods.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук С. Г.Ташута

Рукопис надійшов 27. 06. 2013р.