Определение ГМО в продуктах питания. Сравнение методик выделения ДНК.

Чмиленко Ф.А., Минаева Н.П., Сидорова Л.П.

Днепропетровский национальный университет имени О Гончара, пр. Гагарина 72, 49010, Днепропетровск, Украина, e-mail: analytic.dnu@mail.ru

Поступила в редакцию 22 октября 2010г. Принята к публикации 28 ноября 2010 г.

Описана методика определения ГМО в продуктах питания с помощью полимеразной цепной реакции «в реальном времени». Проведен сравнительный анализ методов выделения ДНК в пробоподготовке пищевых продуктов и тест-систем трех различных производителей для регистрации аналитического сигнала.

CMILENKO F.A., MINAEVA N.P., SIDOROVA L.P. GMO DETERMINATION IN FOOD PRODUCTS.COMPARSION OF DNA EXTRACTION METHODS.- A technique for determination of GMOs in food by polymerase chain reaction "in real time." A comparative analysis of methods of DNA extraction for sample preparation of food and test systems of three different manufacturers for the registration the analytical signal.

Ключевые слова: генетически модифицированные образцы, метод полимеразной цепной реакции, ДНК, тест-системы, аналитический сигнал.

Keywords: genetically modified samples, method of polimeraz chain reaction, DNA, test-systems, the analytical signal.

ВСТУПЛЕНИЕ

Генетически модифицированные организмы (ГМО) – это продукты, созданные путем введения в клетки фрагментов чужеродной или измененной собственной ДНК с целью придания ему новых «полезных» для человека свойств, таких, например, как устойчивость к гербицидам, вредителям, неблагоприятным факторам окружающей среды, повышение урожайности и т.п.

Известно, что к настоящему времени с помощью генной инженерии в мире получены генетически модифицированная соя, кукуруза, картофель, томаты, рис, рапс.

Согласно постановлению КМУ № 468, принятому в Украине в мае 2010 г все продукты питания, содержащие генетически модифицированные организмы, должны иметь обязательную маркировку. Продукты без соответствующих отметок должны изыматься из оборота. Предельный уровень содержания ГМО в пищевой продукции, не требующий маркировки, составляет 0,9%.

Контроль ГМО можно осуществлять выявлением новых, синтезированных в результате трансформации растений, относительно простых химических соединений, например, жирных кислот или выявлением новых протеинов, или нуклеиновых кислот (ДНК, РНК). В случае идентификации нового химического соединения имеет смысл использовать методы химического анализа (ЯМР, хромато-масс-спектрометрию, жидкостную хроматографию и т.д.). Работы Козлова Г.В. [1] посвящены выявлению возможностей методов лазерной спектроскопии для анализа процессов модификации молекулярных объектов, которые входят в состав пищевых продуктов. Впервые показано, что при переходе от природных форм соевой муки к генетически модифицированным формам в спектрах флуоресценции выявлено смещение положения максимума интенсивности в длинноволновой области спектра. Разработанная методика позволяет проводить идентификацию микроорганизмов. Известно использование вольтамперометрии переменного тока [2] при исследовании процессов гибридизации ДНК и определения авидина в трансгенной кукурузе. Предложено [3] использовать метод газовой хроматографии, а также имунноферментные методы для определения и идентификации ГМИ. Описан разработанный метод быстрого детектирования мутантов и полиморфизмов отдельных нуклеотидов высокоэффективным способом при использовании автоматизированной системы капиллярного электрофореза. Метод основан на отличиях в определенной области температур в скоростях миграции в денатурированном полиакриламидном геле природной и модифицированной ДНК [4]. Рассмотрен метод капиллярного гель-электрофореза в микрочипе с использованием программированных градиентов силы поля для ультрабыстрого определения ГМО в соевых бобах [5]. Известен метод идентификации с помощью, так называемой техники «выстрела из

© Чмиленко Ф.А., Минаева Н.П., Сидорова Л.П

ружья» посттрансляционных модификаций с использованием масс-спектрометрии [6].

В работах [7-9] показана возможность использования биологических тестов при сертификации исследований пищевых продуктов, которые позволяют в короткое время определить наличие или отсутствие мутагенных соединений в исследуемом продукте. В работе [10] рассмотрена перспектива применения ДНК-повреждающего теста для оценки биобезопасности пищевых продуктов. Описано применение ДНК-повреждающего теста с бактериальным тест-объектом в пищевой промышленности – мясоперерабатывающей и хлебопекарной, – что позволяет выявить как потенциально отрицательные, так и положительные свойства пищевых продуктов. Однако существенное значение имеет проблема адекватной оценки полученных данных и интерпретация их для человека. Выбран и адаптирован к условиям поточного проведения анализов наиболее достоверный метод определения содержания ДНК в пищевых продуктах [11]. Показано на примере соевых белковых препаратов, что выбранный и усовершенствованный метод количественного определения ДНК с помощью дифениламина дает адекватные результаты. Проведено сравнение аминокислотного состава соевых белковых препаратов немодифицированной сои и их трансгенных аналогов. Разработаны системы контроля, которые гарантируют безопасность использования мясных продуктов; такие системы осуществляются на генетическом уровне, то есть, дают возможность убедиться в сохранении характерного генотипа – структуры и порядка расположения генов; приведены типичные схемы проведения таких генетических испытаний говядины [12].

Авторы [8] представили геннодиагностический тест для определения качества мяса, основанный на изолировании генов; описано применение этого теста. Предложен новый эффективный метод контроля реакций токсикантов в клетках, который может анализировать тысячи генных транскриптов [9].

Наиболее распространенным способом контроля трансгенных продуктов является способ, основанный на цепной реакции полимеразы (ПЦР). В работах [13-23] описано применение методов ПЦР при анализе различных продуктов; отмечены преимущества и недостатки данного способа.

Все методы определения ГМО в продуктах питания можно разделить по мнению авторов [33] на три группы:

1) химические (выявление изменений химического состава);

2) иммуноферментные ИФА (выявление модифицированного белка с помощью специфических антител);

3) метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) (выявление рекомбинантной ДНК)

Каждый из перечисленных методов обладает своими достоинствами и недостатками:

1. Химические методы анализа весьма чувствительны, однако требуют наличия дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала.

2. Методы иммуноферментного анализа являются одними из наиболее распространенных и доступных, но они позволяют выявить лишь продукты экспрессии рекомбинантной ДНК.

3. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в отличие от приведенных выше методов, позволяет обнаружить непосредственно рекомбинантную ДНК. За счет высокой чувствительности метода выявить наличие рекомбинантной ДНК можно в очень низких концентрациях и практически в любом пищевом продукте.

Все три группы методов позволяют проводить как качественное, так и количественное определение трансгенного компонента или вещества, вызванного генетической модификацией [24-35].

Исходя из данных табл.1 нами выбран третий метод ПЦР в реальном времени. Преимущества метода: высокая специфичность, упрощение процедуры анализа, сокращение времени исследования, возможность количественного анализа, снижение возможности контаминации.

Суть метода – многократное копирование определенных фрагментов ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты ДНК вновь копируются ферментом ДНК-полимеразой. Продукты амплификации в качестве аналитического сигнала могут детектироваться по конечной точке (электрофорез, гибридизационно-ферментный анализ, флуоресцентная детекция после ПЦР) и в реальном времени.

Согласно [36], аналитический процесс ПЦР-определения состоит из следующих этапов:

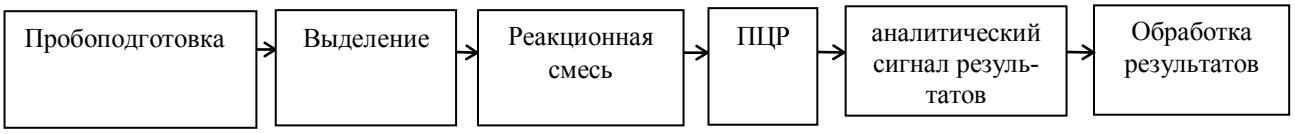

Таблица 1. Сравнение различных методов определения ГМО в пищевых продуктах [33].

метод	специфичность	универсальность	доступность
Химический анализ	+	–	–
ИФА	+	–	+
ПЦР	+	+	+

Рис.1. Схема лабораторного исследования в пробоподготовке образца пищевой продукции.

Сущность метода. Метод выявления ГМО в сырье и пищевых продуктах растительного происхождения с помощью тест-систем основан на использовании полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени. Метод ПЦР в реальном времени основан на детектировании сигнала флуоресценции, позволяющем наблюдать процесс накопления продукта в процессе реакции. Сигнал флуоресценции нарастает пропорционально увеличению количества продукта амплификации в исследуемом образце. Момент заметного увеличения сигнала и отрыв его от базовой линии, так называемый пороговый цикл, зависит от исходного количества ДНК - мишени. Причем, чем больше количество ДНК в образце, тем, раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

Метод основан на одновременной амплификации трех участков ДНК, выделенной из анализируемого образца – последовательности промотора вируса 35S мозаики цветной капусты (pr35S) и терминатора (tNOS), как наиболее распространенных в настоящее время элементов генно-инженерный конструкций, и гена алкоголь дегидрогеназы (Adh1) кукурузы, как эндогенного видоспецифичного контроля ПЦР реакции. Регистрация продуктов амплификации каждого из участков производится по изменению флуоресценции красителей, которыми мечены зонды пробы при их разрушении за счет 5'-экзонуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Аппаратура и реактивы. Для анализа использована система для проведения ПЦР в режиме реального времени ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, США), позволяющая с высокой точностью определять количество генетически модифицированной ДНК, выделенной даже из продуктов глубокой переработки расти-

© Чмиленко Ф.А., Минаева Н.П., Сидорова Л.П

тельного сырья. На стадии выделения ДНК используются также: мельница-гомогенизатор (Retch, Германия), высокоскоростная центрифуга Microfuge 18 (Beckman Coulter, США), термостат и центрифуга-вортекс (Biosan, Латвия), спектрофотометр биологический SmartSpec Plus (США), необходимый для оценки чистоты и количества выделенной ДНК, бокс биологической безопасности 4 класса с вертикальным потоком воздуха и ПЦР бокс. При проведении испытаний продукции, на содержание генетически модифицированных организмов использовались американские тест-системы и сертифицированные стандартные образцы Института референсных материалов**:** TagMan GMO Soy 35S Detection Kit **(**Applied Biosystem, Макрохім); Соя/35S/NOS скрининг и Кукуруза/35S/NOS скрининг, Соя/35S количество, Кукуруза/35S количество (Россия) ПЦР-РВ смесь ГМО-кукуруза и ПЦР-РВ смесь ГМО-соя (ГП «Укрметртестстандарт», Украина).

***Подготовка образцов*.** Исследуемые образцы пищевых продуктов или их компоненты, сначала готовили для извлечения из них ДНК инактивации или удаления примесей, которые могут ингибировать ПЦР. С этой целью использовали различные методики подготовки образцов ДНК. Независимо от того, какой метод использовали для подготовки образца, важно полностью изолировать отдельные образцы для предотвращения перекрестного загрязнения таким образом, чтобы образцы, добавляемые в реакционную смесь ГМО, не содержали примесей. Метод анализа является настолько чувствительным, что наличие даже следовых количеств перекрестного загрязнения может привести к кажущимся ложноположительным результатам анализа.

Если образцы пищевых продуктов не переведены в порошкообразную или гранулированную форму, то перед экстракцией ДНК проводим их предварительную пробоподготовку измельчением. Образцы в виде муки мелкого или грубого помола являются идеальными для экстракции ДНК, а образцы в более грубой форме для повышения эффективности экстракции ДНК необходимо сначала измельчить или растереть до образования относительно мелких частиц. После измельчения образца его взвешиваем и используем соответствующее количество в зависимости от способа экстракции ДНК. Схема лабораторного исследования в пробоподготовке образца пищевой продукции приведена на рис.1. В данной работе извлечение ДНК проводили по трем разным методикам, в зависимости от использования различных наборов для выделения ДНК и тест-систем, которые в дальнейшем использовались в анализе, и провели их сравнительный анализ.

Рассмотрим методики выделения ДНК из пищевых продуктов и растительного сырья с помощью наборов для выделения трех различных производителей;

1) Nucleo Spin Food (США);

2) «Сорб-ГМО-А» производство «Синтол» (Россия);

3) Комплект реактивов для выделения ДНК (Украина).

Методика 1 (США)

Помещаем в пробирки для микроцентрифуги по 100-200 мг каждого гомогенизированного образца и стандарта. Добавляем подогретый до 65 °С буфер CF - по 550 мкл и протеиназу К - по 10 мкл, перемешиваем на мешалке Вортекс. Прогреваем 30 мин. при 65 °С, периодически перемешивая, центрифугируем образцы в течение 10 мин. при 10000 об/минуту. Отбираем супернатант из каждого образца, измерив его объем, и помещаем в новые пробирки. Добавляем буфер С4 и этанол - в объемах, равных объему супернатанта и перемешиваем на мешалке Вортекс. Помещаем колонки NucleoSpin® в коллекционные пробирки, а полученную смесь в колонки NucleoSpin®. Центрифугируем 1 мин. при 11000 об/минуту. Удаляем раствор, прошедший сквозь колонку NucleoSpin®. При необходимости, помещаем в колонки NucleoSpin® остатки смеси, не вошедшей в колонку за 1 раз. Центрифугируем 1 мин. при 11 000 об/минуту и удаляем раствор, прошедший сквозь колонку NucleoSpin®. Помещаем колонки NucleoSpin® в новые коллекционные пробирки. Приводим три промывки. Первая промывка: приливаем в колонки NucleoSpin® по 400 мкл буфера CQW и центрифугируем 1 мин. при 11000 об/минуту. Удаляем раствор, прошедший сквозь колонку.

Вторая промывка: приливаем в колонки NucleoSpin® по 700 мкл буфера С5 и центрифугируем 1 мин. при 11 000 об/минуту. Удаляем раствор, прошедший сквозь колонку. Третья промывка: приливаем в колонки NucleoSpin® по 200 мкл буфера С5. Центрифугируем 2 мин. при 11000 об/минуту. Удаляем раствор, прошедший сквозь колонку. Помещаем колонки NucleoSpin® в пробирки для микроцентрифуги. Приливаем в колонки NucleoSpin® по 100мкл буфера CE, подогретого до 70 °С. Инкубируем колонки NucleoSpin® с буфером CE 5 мин. при комнатной температуре. Центрифугируем 1 мин. при 11 000 об/минуту. Получаем растворы ДНК, которые непосредственно используем для проведения ПЦР. Удаляем колонки NucleoSpin®.

Методика 2 выделения ДНК(Россия)

Измельченные навески образцов (50-100 мг) переносим в одноразовые микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл или 2.0 мл. Вводим в каждую пробирку по 800 мкл лизирующего буфера и 15 мкл. протеиназы К. Тщательно перемешиваем на вортексе или с помощью стеклянной палочки. Инкубируем смесь 30 минут при температуре +60 °С, периодически перемешивая на вортексе (каждые 5-10 минут). Остужаем

пробирки (1-2 минуты) и центрифугируем смесь 5 минут при (12-14)·10^3 об/мин. Во время лизиса и центрифугирования готовим осаждающий Реактив. Для этого в новую пробирку на 1,5 мл вносим 200 мкл буфера для сорбента и 40 мкл сорбента. Верхнюю водную фазу из пробирок с образцами в объеме 300 мкл переносим отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами в пробирки с осаждающим Реактивом. Интенсивно перемешиваем пробирки на вортексе до полного ресуспензирования сорбента. Инкубируем при комнатной температуре 10 минут, периодически встряхивая пробирку. Центрифугируем суспензию при 7 тыс. об/мин 1 минуту. Удаляем супернатант, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Добавляем к осадку 300 мкл промывочного раствора А и повторяем предыдущие операции. Затем добавляем к осадку дважды по 500 мкл промывочного раствора Б и делаем все тоже, что и ранее. Помещаем пробирки с открытыми крышками в термостат на 60 °С на 10-15 минут до полного испарения жидкости. К сухому осадку добавляем 100 мкл ТЕ-буфера, перемешиваем на вортексе. Инкубируем 5 минут при температуре +60°С, перемешивая каждые 2 минуты. Центрифугируем суспензию при 12-14 тыс. об/мин 2 минуты. Чистую надосадочную жидкость отбираем, не захватывая сорбент, в новую пробирку объемом 0.5 или 1.5 мл.

Методика 3 выделения ДНК (Украина)

Помещаем в штатив соответствующее количество пробирок на 1.5 мл и подписываем их. Вносим по 800 мкл буфера для лизиса и по 100-300 мг гомогенизированного образца в каждую пробирку. Перемешиваем содержимое пробирок на вортексе. Инкубируем 60 минут при 60^0 С. Центрифугируем 10 минут при 12000 об/минуту. Переносим по 300 мкл верхней фазы в новые пробирки (v=1,5 мл). Вносим по 250 мкл хлороформа, насыщенного водой, содержимое пробирок тщательно перемешиваем и центрифугируем 5 минут при 10000 об/минуту. Переносим верхнюю фазу в новую пробирку (v=1,5 мл) и добавляем 500 мл буфера для преципитации. Перемешиваем содержимое пробирок на вортексе. Инкубируем пробирки 60 минут при комнатной температуре и центрифугируем 10 минут при 14000 об/минуту. Затем надосадочную жидкость удаляем, а к осадку добавляем 300 мкл раствора NaCl. Осадок растворяем путем перемешивания на вортексе, затем осаждаем капли центрифугированием. Добавляем 300 мкл хлороформа, тщательно перемешиваем содержимое пробирок и центрифугируем 10 минут при 12000 об/минуту. Верхнюю фазу переносим в новую 1,5 мл пробирку и добавляем 600 96% этанола, осторожно перемешиваем. Центрифугируем 10 минут при 14000 об/минуту и надосадочную жидкость удаляем. В пробирки вносим по 750 мкл 65% этанола и перемешиваем содержимое пробирок. Затем центрифугируем 5 минут при 14000 об/минуту и удаляем надосадочную жидкость. Осадок подсушиваем в течении 5 минут, при температуре 60°С, с открытыми крышками пробирок. В пробирки вносим 100 мкл деионизированной воды (буфера для элюции). Прогреваем пробирки при 60°С в течении 5 минут, периодически перемешивая на вортексе, осаждаем капли центрифугированием на вортексе. Полученные образцы ДНК анализируем.

Анализ ДНК

Для анализа ДНК готовим реакционные смеси и устанавливаем прибор с определенным термическим циклом ПЦР. Обязательным моментом для раскапывания является приготовление смеси непосредственно перед использованием. При этом проводим расчет нужного количества:

- для исследуемых образцов при двух повторениях;
- 2 отрицательных контроля;
- 2 положительных контроля.

Любая смесь содержит в своем составе комплект набора реактивов для определения ГМО: буферный раствор, праймеры, аналитические зонды и другие компоненты реакционной смеси.

Реакционную смесь для анализа образцов готовим из контрольных реакционных смесей (mix-смесей) добавлением туда ДНК-полимеразы. Затем все это перемешиваем на вортексе в течение 10 сек и используем в виде основы при раскапывании. Раскапываем в пробирки с плоскими прозрачными крышками на 0,2 мкл; *стрипы; планшеты оптические*.

Приготовленную смесь вместе с полимеразой вносим в пустые лунки или пробирки, приготовленные для анализа добавляем нужное количество приготовленных образцов ДНК. Обязательным моментом при этой процедуре является постановка двух отрицательных и двух положительных контролей. Также мы еще используем постановку 2 отрицательных контролей при выделении ДНК (чтобы проверить чистоту реактивов при использовании в процессе выделения ДНК). Затем перемешиваем содержимое и центрифугируем 20 секунд перед загрузкой в систему ПЦР в реальном времени 7300. Открываем крышку блока прибора и ставим образцы для анализа.

Прибор обязательно программируем под каждую методику. В первом случае используется две мишени, во втором случае – четыре, в третьем - три. После чего ставим в прибор плашку и запускаем программу.

Качественное обнаружение наличия ГМО

Качественное определение ГМО основано на идентификации генетически модифицированных (ГМ) регуляторных последовательностей 35S-промотора и NOS-терминатора. «Тест-система для обнаружения ДНК ГМО (35S-

© Чмиленко Ф.А., Минаева Н.П., Сидорова Л.П

промотор, NOS-терминатор)» применяется при скрининговых исследованиях пищевой продукции, полученной из /или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего ГМ аналоги. При использовании данной тест - системы одновременно в одной пробирке проходит три независимых реакции . Одна реакция позволяет обнаружить фрагмент ДНК 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV), который присутствует во всех известных и выращиваемых в промышленных масштабах ГМ растениях. Другая реакция позволяет обнаружить фрагмент ДНК **NOS** терминатора Т1 плазмиды *Agrobacterium tumefacien*s, который также присутствует во многих промышленно выращиваемых ГМ растениях. Наличие положительной динамики для одной или обеих реакций говорит о наличии в образце ДНК ГМ растения. Третья реакция – реакция внутреннего положительного контроля (**ВПК**) – позволяет исключить ложноотрицательные результаты. Положительная динамика по реакции ВПК, в случае отсутствия положительной динамики по двум другим реакциям, подтверждает отсутствие ДНК ГМ растения в образце. Протекание каждой из трех реакций детектируется с помощью специфического зонда, меченного заданным флуоресцентным красителем.

Количественное определение ГМО

Для количественного определения ГМО в пищевых продуктах используют тест системы, предусматривающие определение содержания чужеродной ДНК относительно геномной ДНК растений. Для получения результатов исследования образца используется амплификационная часть, калибровочные образцы и специальное программное обеспечение, позволяющее производить обработку получаемых в эксперименте данных.

Количественное определение ГМО растительного происхождения основано на расчёте отношения количества ДНК определенной линий ГМ растения к общему количеству ДНК анализируемого растения, выраженного в процентах. В каждой тест-системе для количественного определения ГМО одновременно проводятся две независимые реакции в одной пробирке. Одна реакция позволяет обнаружить ДНК анализируемого растения (соя, кукуруза и т.п.). Другая реакция позволяет обнаружить последовательность, специфичную для конкретной линии ГМ растения. Протекание каждой реакции детектируется с помощью специфического зонда. Для обнаружения ДНК анализируемого объекта (соя, кукуруза) используется зонд, меченный красителем **R6**G, а для обнаружения генетической вставки – красителем FAM или ROX в зависимости от типа прибора. Определение процентного содержания ГМО происходит с использованием калибровочных образцов (КО), которые представляют собой смеси ДНК растения дикого типа (0 % ГМО) и ДНК ГМ линии (100 % ГМО) в определенном процентном соотношении. Разность значений пороговых циклов двух реакций для калибровочных образцов используется для построения калибровочной прямой. С помощью калибровочной прямой рассчитывается процентное содержание ДНК ГМО в анализируемых образцах. *«Тест-система для определения процентного содержания ДНК ГМ сои Roundup Ready линии GTS 40-3-2»* предназначена для количественного определения ДНК ГМ сои Roundup Ready™ (Monsanto Inc, линия GTS 40-3-2,устойчивая к глифосату). *«Тест-система для определения процентного содержания ДНК ГМ кукурузы MON 810»* предназначена для количественного определения ДНК ГМ кукурузы YieldGard ® Corn Borer Corn MON 810 (Monsanto Inc, устойчивая к кукурузному мотыльку). Тест-системы поставляются в вариантном исполнении в зависимости от модели прибора, используемого в лаборатории. Вариант исполнения определяется набором светофильтров, имеющихся в приборе.

Для интерпретации результатов, полученных с помощью ПЦР «в реальном времени», применяют метод относительного количественного определения (метод сравнения пороговых значений циклов амплификации (Ct)). Для случаев, когда эффективность амплификации чужеродной и нормировочной ДНК совпадает, используют формулу: ΔCt = Ct(чужеродная ДНК) – Ct(нормировочная ДНК)

Расчет содержания чужеродной ДНК относительно нормировочной производят с использованием калибровочной прямой, строящейся на основании тестирования калибровочных образцов с известным соотношением чужеродной и нормировочной ДНК, проводимого одновременно с исследуемыми образцами. Калибровочную прямую строят следующим образом: по оси Х откладывают ΔCt, по оси У откладывают десятичный логарифм процентного содержания чужеродной ДНК относительно нормировочной ДНК. Обрабатываем результаты в программе GMO Macros. Программное обеспечение позволяет выполнять приведенные выше вычисления в автоматическом режиме. Результатом эксперимента является построение калибровочной прямой, расчет ее параметров и определение процентного содержания ГМО в исследуемых образцах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная характеристика методик выделения ДНК *(табл.2,3).*

а) Во всех трех методах масса навески для выделения различна, но колебания навесок незначительные, при этом в методе № 2 образцы разделены на жидкие и сыпучие..

б) В первых двух методах в стадии лизиса при добавлении лизирующего буфера темпера-

тура в термостате для инкубации выше на 5 °С, чем в третьем случае.

в) После лизиса образцы центрифугируют, во втором случае время сокращено в 2 раза..

г) Главным отличием всех трех методик является то, что для выделение ДНК на стадии отмывания и преципитации используются разные способы. В первом случае отмывка ДНК идет с помощью колонок, с нанесенным слоем сорбента, которые помещаются в коллекционные пробирки. Во втором случае для этого процесса используют сорбент в виде эмульсии. В третьем случае это все проводится с помощью растворителей хлороформа и гексана (для жирных образцов) и буфера для преципитации.

д) В третьем случае используется этиловый спирт разной концентрации (96% и 65%) в стадии отмывания.

е) На стадии растворения ДНК в буфере для элюции используется разная температура для инкубирования, но время остается неизменным.

ж) Одним из отличий есть разная скорость при центрифугировании на стадии выделения ДНК.

Табл. 2. – Сравнительная характеристика методик выделения ДНК.

	Методики		
	1	2	3
Масса навески, мг	100-200	50-100	100-150
Время проведения выделения, час	2,5	2,0	3,5
Стоимость набора для выделения ДНК, грн	2500	1000	500
Очистка ДНК	колонки NucleoSpin	сорбент	растворители (хлороформ), спирт (96% и65%)
Температура инкубации, °С	65	60	60
Время центрифугиро- вания за весь период выделения ДНК, мин.	17	11	50

Табл. 3. Сравнительная характеристика чистоты выделенной ДНК.

Название набора для выделения ДНК	Объект исследования (линия MON 810)	Чистота ДНК при A260/A280	Концентрация выделенной ДНК mg/ml
NucleoSpin Food(США)	Стандартный раствор кукурузы 0,1%	1,95	50,89
	Стандартный раствор кукурузы 1%	1,91	61,49
	Стандартный раствор кукурузы 5%	2,01	82,27
«Сорб-ГМО-А», Синтол,Россия	Стандартный раствор кукурузы 0,1%	1,67	46,89
	Стандартный раствор кукурузы 1%	1,71	56,78
	Стандартный раствор кукурузы 5%	1,79	65,89
Комплект реактивов для выделения ДНК, Украина.	Стандартный раствор кукурузы 0,1%	1,77	50,04
	Стандартный раствор кукурузы 1%	1,80	57,82
	Стандартный раствор кукурузы 5%	1,83	70,87

 © Чмиленко Ф.А., Минаева Н.П., Сидорова Л.П

Табл. 4. – Сравнительная характеристика методик на стадии анализа ДНК.

Стадии амплификации	Методики		
	1	2	3
Количество приготовленной реакционной смеси, мкл.	22,5	20	17
Температурный режим	94°С – 9 мин, 95°С – 20 сек, 60°С – 30 сек, 72°С – 30 сек.	95°С – 5 мин, 95°С – 15 сек, 55°С – 40 сек	94°С – 5 мин, 95°С – 15 сек, 59°С – 40 сек
Время проведения анализа, мин	90	72	81
Количество мишеней	2	4	3
Количество циклов	40	45	42
Количество выделенной ДНК для добавления в реакционную смесь, мкл	2,5	2,0	2,0

Сравнительная характеристика наборов для количественного определения генетически модифицированных источников *(табл. 4).*

Использовали три различных набора (тест-систем) для количественного определения генетически модифицированных источников **(**ГМИ) – «TaqMan®GMO Maize 35S Detectsion Kit» (США); «Кукуруза 35S количество» (Россия); «ПЦР-РВ смесь ГМО-кукуруза» (Украина).

1. Разное количество реакционной смеси и ДНК- полимеразы во всех трех случаях.
2. Температурные режимы отличаются, а в первом случае еще добавляется одна стадия из температурного режима.
3. Во второй методике мы имеем готовые пробирки с уже раскапаной реакционной смесью.
4. Различно время проведения анализа по всем трем методикам.
5. Разное количество мишеней при программировании прибора, при этом и на графиках мы видим дополнительные линии, отвечающие за каждую мишень.
6. Количество циклов во всех трех методиках различно.

Для оценки точности определения содержания ГМИ методом ПЦР «в реальном времени» нами был проведен следующий эксперимент: использовали три различных набора для количественного определения ГМИ – «TaqMan®GMO Maize 35S Detectsion Kit» (США); «Кукуруза 35S количество» (Россия); «ПЦР-РВ смесь ГМО-кукуруза» (Украина). Все три системы использовались совместно с детектирующим амплификатором – системой для проведения ПЦР в режиме реального времени ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, США),

В качестве исследуемого образца использовали сертифицированный контрольный материал (кукурузную муку IRMM-413-3 MON 810 maize Sample Identification № 2225 [ERM BF 413d], производства Института контрольных материалов и методов, Бельгия) с содержанием (по массе) генетически модифицированной кукурузы линии MON 810 относительно немодифицированной 0,1%, 1,0%. 5,0%.

Проведено два независимых исследования для каждого из выбранных наборов, которое включало серию образцов. После этапа очистки ДНК образцы тестировали при двух повторениях. Экспериментальные данные приведены в табл 5.

ВЫВОДЫ

Описана методика позволяющая идентифицировать и количественно определять ГМО в продуктах питания с помощью полимеразной цепной реакции «в реальном времени». Проведен сравнительный анализ трех методик выделения ДНК в пищевых продуктах и тест-определение («Nucleo Spin Food»(США,) «Сорб-ГМО-А»,Синтол,(Россия), «Комплект реактивов для выделения ДНК» (Украина)), а также дана сравнительная оценка трех различных наборов для количественного определения ГМИ (тест-систем): «TaqMan®GMO Maize 35S Detectsion Kit» (США); «Кукуруза 35S количество» (Россия); «ПЦР-РВ смесь ГМО-кукуруза» (Украина).

Табл. 5. Результаты исследований образцов с 0,1%, 1,0% и 5,0 %-ным содержанием ГМИ.

Набор реагентов	Стандартные образцы, % ГМО	Результаты измерений, % ГМО	S_r, %
TaqMan®GMO Maize 35S Detectsion Kit	0,1	0,09	8,04
	1,0	1,24	3,98
	5,0	4,33	2,02
«Кукуруза 35S количество» (Россия);	0,1	0,10	8,47
	1,0	1,12	4,84
	5,0	4,67	2,73
«ПЦР-РВ смесь ГМО-кукуруза» (Украина).	0,1	0,10	9,50
	1,0	1,13	5,84
	5,0	4,62	3,74

ЛИТЕРАТУРА

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

2. Application of avidin–biotin technology and adsorbtive transfer stripping square-wave voltammetry for detection of DNA hybridization and avidin in transgenic avidin maize / Michal Masarik, Rene Kizek, Karl J. Kramer // Analytical Chemistry. – 2003. – 75, № 11. – С. 2663-2669.

3. Сорокина Е. Ю. Идентификация рекомбинантной ДНК в пищевой продукции: результаты мониторинга / Е. Ю.Сорокина, О. Н. Чернышёва, Н. Н. Филатов // Симпозиум «Функциональное питание, пищевая безопасность и здоровье людей в условиях мегаполиса», Москва, 2-3 дек., 2003: сборник докладов, программа. – М., 2003. – С. 11-13.

4. 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: PITTCON'2002 „Global Technical Conference and Exposition": Book Abstr. – New Orleans: La, 2002. – С. 540.

5. 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. 179-184.

6. Cantin G. T. Strategies for shotgun identification of podttranslational modifications by mass spectrometry / G. T. Cantin, J. R. Yates // Journal of Chromatography A. – 2004. – 1053, № 1-2. – С. 7-14.

7. Великсар Д. С. Сертификационные испытания пищевых продуктов на загрязнённость мутагенными веществами / Д. С. Великсар, И. Ф. Максиян // Партнёры и конкуренты. – 2002. – № 1. – С. 24-28.

8. Looft C. Fleischqualität lässt sich genetisch bestimmen / Christian Looft, Ernst Kalm // Fleischwirtschaft. – 2000. – 80, № 11. – С. 17-18. // Цитировано РЖ Химия. – 2001. – 15-19Р1.193.

9. Buterin T. Potential application of gene expression fingerprinting for food safety screening / T. Buterin, C. Koch, H. Naegeli // Analytica Chimica Acta. – 2005. – 529, № 1-2. – С. 33-39

10. Перспектива применения ДНК-повреждающего теста для оценки биобезопасности пищевых продуктов / Е. В. Никитина, С. В. Китаевская, В. Я. Понамарёв // Пищевая промышленность (Россия).–2006.–№7.–С.40-41, 87.

11. Логинова Е. Н. Разработка метода количественного определения ДНК в соевых белковых препаратах и оценка влияния генной модификации на функционально-технологические свойства продуктов переработки сои: автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. техн. наук / Е. Н. Логинова. – 2004. – 24 с

12. Clapham N. Filiere bovine: l'AND sécurise la traçabilité / N. Clapham // Process Alim. – 2002. – № 1182. – С. 88.

13. Пат. 2259401 Россия, МПК[7] С 12 Р 19/34, С 12 Q 1/68. Сухая смесь реагентов для полимеразной цепной реакции и способ проведения ПЦР-анализа / Шайхаев Г. О. – № 2004112594/13; заявл. 27.04.2004; опубл. 27.08.2005.

14. Schwägete F. Analytik bei Fleisch Bewertung immunologischer und gentechnischer Methoden / Fredi Schwägete // Fleischwirtschaft. – 2001. 81, № 2, С. 78-81.

15. Сердобинский Л. А. Определение генетически модифицированных источников (ГМИ) в продуктах питания и пищевом сырье / Л. А. Сердобинский // Пищевая промышленность (Россия). – 2007. – № 3. – С. 6-7, 85.

16. Heller K. J. Nachweis gentechnisch veränderter Lebensmittel / Knut J. Heller // Schriftenr. Agrar-und Ernährungswiss. Fak. Univ. Kiel. – 2003. – № 98. – С. 215-223. // Цитировано РЖ Химия. – 2004. – 15-19Р1.35.

 © Чмиленко Ф.А., Минаева Н.П., Сидорова Л.П

17. Development and applications of real time PCR standards for GMO quantification based on tandem-marker plasmids / Elia Mattarucchi, Florian Weighardt, Cristina Barbati // Eur. Food Res. and Technol. – 2005. – 221, № 3-4. – С. 511-519.

18. Куликов А. М. ГМО и риски их использования / А. М. Куликов // ГМО-скрытая угроза России: Материалы к Докладу Президенту Российской Федерации. „По анализу эффективности государственного контроля за оборотом генетически модифицированных продуктов питания" (п. 3 "и" Протокола 4 совместного заседания Совета Безопасности и Президиума Госсовета РФ от 13.11.2003 г.). – М., 2004. – С. 46-71.

19 Development of a polymerase chain reaction assay for detection of three canola transgenes / Tigst Demeke, Randal W. Giroux, Shari Reitmeier [та ін.] // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2002. – 79, № 10. – С. 1015-1019.

20. Заявка 19718705 Германия, МПК^6 C 07 H 21/04, C 12 Q 1/68. Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Arzahl von Transgenkopien in gentechisch veränderten Zellen / Fiehn Christoph, Wettschureck Nina, Krauthoff Alexandra. – № 19718705.6; заявл. 2.5.97; опубл. 5.11.98.

21. Detection of genetically modified BT-maize in cooked food products by PCR / A. Rizzi, F. Agosti, D. Daffonchio // Ital. Journal of Food Science. – 2001. – 13, № 3. – С. 265-273.

22. Garcia-Cañas V. Quantitation of transgenic Bt event-176 maize using double quantitative competitive polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis laser-induced fluorescence / Virginia Garcia-Cañas, Alejandro Cifuentes, Ramón González // Analytical Chemistry. – 2004. – 76, № 8. – С. 2306-2313.

23. Chiacchierini E. Studio statistico applicator alla metodica di campionamento di sementi transgeniche / E. Chiacchierini, D. Restuccia, G. Vinci // Tecn. Molit. – 2005. – 56, № 6. – С. 611-616.

24. ГОСТ Р 52173:2003 Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения.

25.ГОСТ Р 52174:2003 Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения с применением биологического микрочипа.

26. ДСТУ ISO 21569:2008 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів та їх похідних. Якісний метод на основі аналізу нуклеїнової кислоти

27. ДСТУ ISO 21570:2008 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів та їх похідних. Кількісний метод на основі аналізу нуклеїнової кислоти

28. ДСТУ ISO 21571:2008 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів та їх похідних. Екстрагування нуклеїнової кислоти.

29. ДСТУ ISO 224276:2008 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів та їх похідних. Основні вимоги і визначення

30. ДСТУ CEN/TS 15568:2008 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів та їх похідних. Відбір проб

31. ДСТУ ISO/TS 21098:2009 Додаткові процедури та інформація щодо методів аналізування на основі нуклеїнової кислоти, описаних в ISO 21569, ISO 21570, ISO 21571.

32. ДСТУ ISO 24276:2008. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Основні вимоги, терміни та визначення понять.

33. ПЦР «в реальном времени» /Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др..: под ред. д.б.н. Д.В.Ребрикова – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223с.

34. ДСТУ 5021.1:2008 Соя. Ідентифікація генетично модифікованих організмів. Частина 1 Методи відбирання та правила готування проб.

35. ДСТУ 5021.2:2008 Соя. Ідентифікація генетично модифікованих організмів.

36. Чмиленко Ф.А. Теория измерительно-информационного аналитического сигнала. Днепропетровск. Вісник ДНУ. Сер. Хімічні науки.1988. № 1. С.160-168.