

Каверин Артем Валерьевич

**Совершенствование методов идентификации примесей ГМИ в
продуктах, содержащих компоненты животного и
растительного происхождения**

**16.00.06 – Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена
и ветеринарно-санитарная экспертиза**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Работа выполнена в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации Государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Светличкин Вячеслав Владимирович
(ГНУ ВНИИВСГЭ)

Официальные оппоненты:

- доктор ветеринарных наук,
профессор кафедры товароведения и
безопасности сырья и
продуктов биотехнологии

Сон Константин Николаевич
(Московский
Государственный университет прикладной биотехнологии)

- кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Кононенко Анна Борисовна
(ГНУ ВНИИВСГЭ)

Ведущая организация: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства (ГНУ ВНИИЖ)

Защита состоится «30» ноября 2006 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д.006.008.01. при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5).

Автореферат разослан «__» _____ 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Е.С. Майстренко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

В последние годы значительно увеличилось производство и импорт трансгенной продукции. Общая площадь посевов трансгенных культур в мире в 2005 году составила 90,0 млн. га. За девять лет, с 1996г по 2005г, общая площадь, засеянная трансгенными культурами, возросла более чем в 53 раза (с 1,7 млн. га в 1996г. до 90,0 млн. га в 2005г.). По прогнозам специалистов общая площадь посевов трансгенных культур и число фермеров, выращивающих их, будет возрастать. По данным на 2005 год посевные площади под трансгенными культурами-продуцентами продуктов растительного происхождения занимают в США 49,8 миллиона гектаров, в Аргентине - 17 миллионов гектаров, в странах ЕС - около 0,2 миллиона гектаров, в России трансгенные культуры пока не выращиваются. За десять лет коммерческого использования ГМ-культур объемы потребления, в частности, модифицированной сои составили: в России - 300 тысяч тонн, в странах ЕС - 50 миллионов тонн, в США - 500 миллионов тонн. Список разрешенных для использования в питании и кормах сельскохозяйственных культур на 2005 год, по данным Food and Drug Administration (США), включает более 100 генетически модифицированных продуктов. При этом, согласно данным Роспотребнадзора, ежегодный импорт товаров, произведенных с использованием биотехнологии, оценивается в 650 млн. долл. США. Внутренний ежегодный объем российского рынка биотехнологических товаров превышает 1 млрд. долл. США. В связи с этим увеличивается вероятность поступления пищевой продукции, полученной из ГМИ или содержащей компоненты из ГМИ, на внутренний рынок Российской Федерации.

В настоящее время разработаны правовые документы, регулирующие генно-инженерную деятельность и использование ГМ-продуктов, которые в

обязательном порядке должны подвергаться экспертизе и проходить госрегистрацию, а продукты, содержащие ГМИ, затем маркироваться.

Для Российской Федерации проблема контроля за содержанием в продуктах питания генетически модифицированных компонентов и информацией о содержании ГМИ в продуктах питания, которая доводится изготовителем до потребителя, становится актуальнее год от года. Во многом это определяется активным присутствием на рынке импортных пищевых продуктов, содержащих растительные компоненты.

В настоящее время значительная часть импортируемых в Россию продуктов содержат компоненты из ГМИ (в основном сои). Трансгенные белки сои постоянно возрастающими темпами замещают в продуктах питания биологически полноценные животные белки и растительные белки традиционных культур. Важно, что современные регламенты производства любых продуктов питания не ограничивают содержание в них трансгенных растительных белков, а только требуют их маркировки. Учитывая, что замена трансгенным соевым белком белков животных - сверхвыгодный бизнес, и это создает условия для фальсификации продукции животного происхождения. Сейчас средний россиянин съедает в год 32 кг натурального мяса и рыбы, что на 40% меньше медицинской нормы. При продолжающейся замене животных белков соевыми он в 2006-2007 годах уже будет съедать только 20-25 кг животных белков (Монастырский О.А., 2004).

По данным исследований, проведенных Роспотребнадзором РФ (Иванов А.А., 2004) в 2004 г. по сравнению с 2003 г. было исследовано в три раза больше проб на наличие генетически модифицированных источников (ГМИ) - 12 956 проб продовольственного сырья и пищевых продуктов. Наибольшее количество проб, содержащих ГМИ, в абсолютных значениях, в 2004 г. выявлено в мясной продукции - 946 (в 2003 г. - 272) и «прочей» продукции, основу которой составили растительные белки - 466 (в 2003 г. -

129). В незначительном количестве ГМИ встречались в хлебобулочных и мукомольно-крупяных изделиях (44 пробы), птице и птицеводческих продуктах (29 проб), продуктах детского питания (13 проб) и консервах (13 проб).

В связи с этим необходимо идентифицировать продукцию содержащую примеси ГМИ в продуктах животного и растительного происхождения. На сегодняшний день это является одной из актуальнейших задач биотехнологии. Для этого необходимы разработка и создание высоко эффективных диагностических тест-систем для выявления трансгенных растений в пищевых продуктах, продовольственном сырье, семенном материале, кормах животных, лекарственном сырье. Основой современных методик служат качественные и количественные методы. Данные методики должны позволять проводить определение ГМИ как в термообработанных продуктах, так и нативных.

Цель и задачи исследований.

Целью исследований являлось совершенствование методов идентификации примесей ГМИ в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения.

В задачи исследований входило:

- разработка и оптимизация методов выделения и очистки ДНК из продукции животного и растительного происхождения для качественного и количественного определения ГМИ;
- сравнительная характеристика методик выделения ДНК;
- совершенствование методики качественного определения ГМИ на основе ПЦР с электрофоретической детекцией ампликонов;
- разработка модифицированной методики качественного определения ГМИ на основе ПЦР в реальном времени;
- совершенствование методики количественного определения ГМИ на основе ПЦР в реальном времени;

- проведение мониторинговых исследований по выявлению фальсифицирующих примесей из ГМИ в продуктах животного и растительного происхождения.

Научная новизна:

Разработаны модифицированные высокоэффективные методики выделения ДНК с использованием ионного детергента СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), а также с использованием сорбента Silica (SiO_2). Разработанные методики позволяют получать свободную от ингибирующих примесей и в необходимых количествах ДНК из различных продуктов, содержащих компоненты животного и растительного происхождения. ДНК пригодна для качественного и количественного анализа. Методики могут использоваться для экстракции и очистки ДНК как многокомпонентных смесей, так и однокомпонентных.

Усовершенствованы методики качественного определения ГМИ (соя и кукурузы), включающие экспрессное выделение ДНК с использованием сорбента Silica (SiO_2) или ионного детергента СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), постановку ПЦР с использованием праймеров на лектин и крахмальную синтазу и последующим электрофоретическим разделением ампликонов.

Проведены исследования по совершенствованию методик определения ГМИ на основе ПЦР в реальном времени, включающие экспрессное выделение ДНК с использованием сорбента Silica (SiO_2) или использование ионного детергента СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), амплификации ДНК с мечеными ДНК-зондами (представляющие собой олигонуклеотид, несущий флуоресцентный краситель и флуоресцентный гаситель), используемые для качественной и количественной оценки продукта.

Разработана модифицированная методика качественного обнаружения ГМИ с использованием 35S промотора, NOS терминатора и внутреннего положительного контроля в одной реакционной смеси, включающую

ускоренную пробоподготовку и оценку результатов на основе ПЦР в реальном времени.

Показана высокая чувствительность и специфичность разработанных количественных методик модифицированных методик количественного определения ГМИ на основе ПЦР в реальном времени (сои Roundup Ready линии GTS 40-3-2, кукурузы линии MON 810), позволяющих обнаруживать в образце ГМИ менее 0,1 % как в сырье, так и в продуктах питания, в том числе термообработанных. Время анализа сокращается в 1,5-2 раза.

Проведены мониторинговые исследования в сырье и продуктах питания с использованием разработанных методик, показавших возможность использования их для скрининговых и количественных тестов выявления недекларированных ГМИ в продуктах животного и растительного происхождения.

Практическая ценность.

На основании результатов исследований разработаны:

- Методические рекомендации «Качественное определение ГМИ в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения» (утверждены отделением ветеринарной медицины РАСХН 20.10.2006 г.)

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- V Международной конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции» (Москва, 2004 г.).

- заседании Ученого совета ГНУ ВНИИВСГЭ (2005 г.);

- межлабораторном совещании ГНУ ВНИИВСГЭ (2006г.);

- V международной научной конференции «Живые системы и биологическая безопасность населения» Москва, МГУ ПБ, 2006 г.

Публикации. Результаты исследований отражены в 5 научных статьях.

Положения, выносимые на защиту.

- разработка и оптимизация методов выделения и очистки ДНК из продукции животного и растительного происхождения для качественного и количественного определения искомой ДНК;
- совершенствование методик качественного определения ГМИ на основе ПЦР с электрофоретической детекцией ампликонов;
- совершенствование методик качественного определения ГМИ на основе ПЦР в реальном времени;
- совершенствование методик количественного определения ГМИ на основе ПЦР в реальном времени;
- сравнительная оценка методов по специфичности, чувствительности и быстродействию;
- проведение мониторинговых исследований по выявлению фальсифицирующих примесей из ГМИ в продуктах животного и растительного происхождения.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложений.

Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц и 16 рисунков. Список литературы включает 150 источников отечественных и зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований.

Работа проводилась в период с 2003 по 2006 гг. Работа выполнена в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации Государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН).

Экспериментальная часть работы проводилась в Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной биотехнологии (ВНИИСБ) на базе ЗАО "Синтол" и лаборатории "Союзэкспертиза" Торгово-промышленной палаты РФ.

Для исследований использовали тест-наборы на основе ПЦР производства России, предоставленные фирмой ЗАО "Синтол", а также тест-наборы серии SureFood на основе ПЦР и ГИФА производства Германии (для идентификации и определения ГМИ). Исследования проводились на приборах отечественного ("Терцик" ДНК-технологии, "АНК-16", "АНК-32", ИАНП РАН) и зарубежного производства ("iCycler", Bio-Rad, "ABI Prism 7000", Applied Biosystems)

Для обнаружения ГМИ каждая проба анализировалась в 5 повторностях проб.

2.2 Результаты исследований.

2.2.1 Разработка и оптимизация методов выделения и очистки ДНК из продукции животного и растительного происхождения.

За основу нашей методики был взят протокол предложенный Мюррай и Томпсоном (Murray and Thompson, 1980). Этот метод подходит для выделения и очистки ДНК из растений и продуктов растительного происхождения. Полученная ДНК свободна от полисахаридов, полифенолов и других ингибиторов ПЦР. Данный протокол широко используется в современной геномной инженерии растений, а также используется для обнаружения ГМИ и рекомендован Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ).

Принцип модифицированного метода заключается в следующем: растительные клетки разрушаются ионным детергентом СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), который образует затем нерастворимый комплекс с нуклеиновыми кислотами в буфере с низкой концентрацией соли. При этом полисахариды и другие примеси остаются в супернатанте и удаляются. Комплекс ДНК-СТАВ переходит в растворимое состояние с

увеличением концентрации соли. Затем полученная ДНК осаждается этанолом, а супернатант, содержащий примеси, удаляется. Полученная ДНК сушится и растворяется в ТЕ-буфере.

Модифицированный и оптимизированный метод требует существенно меньшее время, затрачиваемое на выделение ДНК по сравнению с исходным протоколом. Время анализа сократилось с 5-6 часов до 3-4 для 8 образцов, что особенно важно при скрининговых исследованиях, используемых для выявления и идентификации ГМИ. Для данного протокола характерен широкий спектр объектов для исследований и высокий выход ДНК, что позволяет использовать его для арбитражных решений. При этом выделяется высококачественная ДНК, свободная от различных ингибиторов ПЦР, и пригодная для качественного и количественного анализа ПЦР в реальном времени.

В тоже время при большинстве скрининговых исследований для определения фальсифицированных примесей ГМИ в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения, анализируются образцы, содержащие значительное количество ДНК, такие как колбасы, изоляты, консервы, мука и т.д. При анализе этих продуктов нет нужды использовать методики выделения ДНК дающих большой выход. Однако, затрачиваемое время и качество получаемой ДНК имеет, по-прежнему, огромное значение. Исходя из этих требований, был предложен простой и быстрый протокол выделения и очистки ДНК.

Принцип метода заключается в следующем: растительные клетки разрушаются ионным детергентом СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), который образует затем нерастворимый комплекс с нуклеиновыми кислотами в буфере с низкой концентрацией соли. При этом полисахариды и другие примеси остаются в супернатанте и удаляются. Комплекс ДНК-СТАВ переходит в растворимое состояние с увеличением концентрации соли. ДНК остается абсорбированной на Silica. Затем абсорбированная ДНК

промывается этанолом, а примеси, находящиеся в супернатанте, удаляются. Искомая ДНК сушится и растворяется в ТЕ-буфере.

Полученный модифицированный и оптимизированный метод позволяет экспрессно и высококачественно выделять ДНК для последующего анализа. Время для выделения ДНК из 8 образцов составляет 2-2.5 часа, что особенно важно при скрининговых исследованиях, связанных со значительным количеством обработки продуктов животного и растительного происхождения, возможно, содержащих ГМИ. Метод характеризуется хорошим выходом ДНК. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также вследствие отмывок. Выделяемая ДНК высококачественна и свободна от различных ингибиторов ПЦР, способных вызвать непригодные результаты анализов. Полученная ДНК пригодна для качественного и количественного анализа методом ПЦР в реальном времени.

2.2.2 Сравнительная характеристика методик выделения ДНК.

Предлагаемые модифицированные и оптимизированные методы позволяют экспрессно и высококачественно выделять ДНК для ПЦР анализа. Необходимое время для выделения 8 образцов СТАВ-методом составляет 3-4 часа, а с использованием Silica 2-2.5 часа, что особенно важно при скрининговых исследованиях, связанных со значительным количеством обработки продуктов животного и растительного происхождения, возможно, содержащих ГМИ. Методы характеризуются высоким выходом ДНК. Однако при использовании сорбента Silica возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также вследствие отмывок. Выделяемая ДНК высококачественна и свободна от различных ингибиторов ПЦР, способных вызвать непригодные результаты анализов.

Чистота полученной ДНК доказана спектрофотометрически. Отношение по белку A_{260}/A_{280} для полученных ДНК обоими методами равно 1.8. По полисахаридам A_{260}/A_{230} примерно 2.2. Полученная ДНК пригодна

для качественного и количественного анализа методом ПЦР в реальном времени.

Таблица 1

Результаты сравнительных исследований методик выделения ДНК.

	ДНК-СТАВ	ДНК-СОРБЕНТ
Необходимое время для выделения 8 образцов	3-4 часа	2-2,5 часа
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.8	1.8
A ₂₆₀ /A ₂₃₀	2.2	2.2
Выход ДНК	высокий	Возможны потери
Работа с агрессивными средами	нет	Нет
Наличие специального оборудования	нет	Нет

Методы выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов, по сравнению с зарубежными аналогами, отличаются более низкой стоимостью и доступностью реактивов, не уступая им по остальным критериям.

Предложенные нами методы выделения имеют практическое значение для ежедневной лабораторной практики. Выделенная и очищенная данными методами ДНК позволяет проводить, как скрининг продуктов и продовольственного сырья, так научные исследования, требующие наличия высококачественной ДНК. При этом предложенные методы просты и экспрессны, характеризуются высоким выходом свободной от различных примесей ДНК, что подтверждается спектрофотометрией и сравнением с характером кривой экспоненциального роста накопления продуктов амплификации ДНК, выделенной классическим методом, описанный Мармуром. Метод включает в себя ферментативный протеолиз с последующей депротеинизацией и пересадением ДНК спиртом. Этот

метод позволяет получить чистый препарат ДНК. Однако, он довольно трудоемок и предполагает работу с таким агрессивным и вредным веществом, как фенол. Разработанные нами методики исключают работу с такими агрессивными и вредными реагентами, как фенол, изопропанол, не требуют наличия высококвалифицированного персонала и сложного оборудования. Экстракцию и очистку ДНК возможно проводить в небольших и передвижных лабораториях, обладающих необходимым оборудованием.

2.2.3 Совершенствование методики качественного определения ГМИ на основе ПЦР с электрофоретической детекцией ампликонов.

Для качественного определения ГМИ на основе ПЦР были выбраны следующие мишени: 35S промотор, NOS терминатор, ген лектина, ген крахмальной синтазы и модифицированные гены сои и кукурузы.

Для индикации ГМИ использовали усовершенствованную методику пробоподготовки и амплификацию с 35S промотором и NOS терминатором. Эти два участка ДНК наиболее часто встречаются в современных генно-инженерных конструкциях. Наличие хотя бы одного из них позволяет судить о наличии генномодифицированной вставки и делает целесообразным дальнейший анализ.

Для методики обнаружения трансгенной ДНК в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения, использовали промотор 35S вируса мозаики цветной капусты. Подобранные праймеры позволяют получить только один ПЦР-продукт, что говорит о их высокой специфичности. Перекрестных реакций между продуктами, содержащими промотор 35S и не имеющими его, не наблюдалось. Наличие яркой и четкой полосы ампликона свидетельствовало о оптимально подобранных условиях и составе ПЦР-смеси. Амплификация проходила только с продукцией содержащей ГМИ. Таблица 2

Таблица 2.

Качественное определение ГМИ по 35S промотору.

Исследуемые образцы	Наличие ПЦР-продукта
Соя негеномодифицированная	Нет
Кукуруза негеномодифицированная	Нет
Соя ГМИ линии 40-3-2	Да
Кукуруза ГМИ линии Моп 810	Да
Компонент №1 (ISP-1-95), содержащ. ГМИ	Да
Компонент №2 (ISP-2-95), содержащ. ГМИ	Да
Изолят соевого белка, не содержащ. ГМИ	Нет

Для методики обнаружения трансгенной ДНК в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения, мы использовали NOS терминатор *Agrobacterium tumefaciens*.

Таблица 3.

Качественное определение ГМИ по NOS терминатору.

Исследуемые образцы	Наличие ПЦР-продукта
Соя негеномодифицированная	Нет
Кукуруза негеномодифицированная	Нет
Соя ГМИ линии 40-3-2	Да
Кукуруза ГМИ линии Моп 810	Да
Компонент №1 (ISP-1-95), содержащ. ГМИ	Да
Компонент №2 (ISP-2-95), содержащ. ГМИ	Да
Изолят соевого белка, не содержащ. ГМИ	Нет

Подобранные праймеры позволяли получить только один ПЦР-продукт, что говорит о их высокой специфичности. Перекрестных реакций между продуктами содержащими, NOS терминатор и не имеющими его, не наблюдалось. Наличие яркой и четкой полосы ампликона свидетельствовало о оптимально подобранных условиях и составе ПЦР-смеси. Специфичные

ампликоны обнаруживали только в продукции, содержащей ГМИ, и отсутствовали в немодифицированной.

Для определения наличия в анализируемом образце ДНК сои использовали ген лектина Lec. В случае обнаружения в образце вставки 35S промотора, NOS терминатора и гена лектина, проводили идентификацию трансгенной ДНК по сое линии 40-3-2, устойчивой к глифосату. Для этого использовали последовательность специфичную для сои Roundup Ready линии GTS 40-3-2. Данная линия получила широкое распространение и наиболее часто встречается в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения.

Для методики обнаружения ДНК сои в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения, мы использовали ген лектина. Подобранные праймеры позволяли получить только один фрагмент ПЦР-продукт, что говорит о их высокой специфичности. Перекрестных реакций между продуктами, содержащими ген лектина и не имеющими его, не наблюдалось. Наличие яркой и четкой полосы ампликона свидетельствует о хорошо подобранных условиях и составе ПЦР-смеси. Амплификация идет только с продукцией, содержащей сою.

Для методики обнаружения трансгенной сои линии 40-3-2, устойчивой к глифосату, в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения использовали специфичную последовательность ДНК. Подобранные праймеры позволяли получить только один ПЦР-продукт, что говорит о их высокой специфичности. Наличие яркой и четкой полосы ампликона свидетельствует о хорошо подобранных условиях и составе ПЦР-смеси. Амплификация идет только с продукцией содержащей, сою линии 40-3-2.

Для определения наличия в анализируемом образце ДНК кукурузы использовали ген крахмальной синтазы SSIIb. В случае обнаружения в образце участков вставки 35S промотора, NOS терминатора и гена крахмальной синтазы SSIIb кукурузы, проводили идентификацию

трансгенной ДНК по кукурузе линии MON 810, устойчивой к стеблевому мотыльку. Последовательность использовали специфичную для трансгенной кукурузы MON 810. Данная линия получила широкое распространение и наиболее часто встречается в продуктах содержащих компоненты животного и растительного происхождения

Для методики обнаружения ДНК кукурузы в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения, мы использовали ген крахмальной синтазы SSIIb. Подобранные праймеры позволяли получить только один ПЦР-продукт, что говорит о их высокой специфичности. Перекрестных реакций между продуктами содержащими ген крахмальной синтазы и не имеющими его не наблюдалось. Наличие яркой и четкой полосы ампликона свидетельствует о хорошо подобранных условиях и составе ПЦР-смеси. Амплификация идет только с продукцией содержащей кукурузу.

Для методики обнаружения трансгенной ДНК кукурузы линии MON 810, устойчивой к стеблевому мотыльку, в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения, мы использовали специфичный модифицированный ген. Подобранные праймеры позволяют получить только один ПЦР-продукт, что говорит о их высокой специфичности. Перекрестных реакций между продуктами содержащими специфичный модифицированный ген и не имеющими его не наблюдалось. Наличие яркой и четкой полосы ампликона свидетельствует о хорошо подобранных условиях и составе ПЦР-смеси. Амплификация идет только с продукцией содержащей кукурузу линии MON 810.

В результате проведенных исследований были усовершенствованы методики качественного определения ГМИ (соя и кукурузы), включающие экспрессное выделение ДНК с использованием сорбента Silica (SiO₂) или ионного детергента СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), постановку ПЦР с использованием праймеров на лектин и крахмальную синтазу и последующим электрофоретическим разделением ампликонов.

2.2.4 Разработка модифицированной методики качественного определения ГМИ на основе ПЦР в реальном времени.

При проведении большого числа мониторинговых исследований сначала используют недорогой качественный ПЦР -анализ. Схема анализа, основанная на электрофоретической детекции ампликонов, весьма трудосмка, требует наличия отдельного помещения для постановки электрофореза, отдельного персонала, не контактирующего с другим персоналом во избежание коштаминации. Однако, главным недостатком диагностических наборов, основанных на классической схеме с использованием электрофореза, является не возможность проведения точной количественной оценки искомой ДНК. Поэтому были предложены методики на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Эта технология не требует постановки электрофореза, способна следить за ходом реакции в режиме реального времени и позволяет количественно оценивать искомую ДНК.

На основе технологии ПЦР в реальном времени были предложены усовершенствованные методики качественного и количественного определения ГМ растений.

Качественная методика предназначена для скрининговых исследований продуктов, содержащих компоненты животного и растительного происхождения. Используется для выявления широко распространенных линий ГМ растений содержащие, участки вставки 35S промотор и NOS терминатор. Для слежения за ходом реакции используется внутренний положительный контроль.

В скрининговой методике используется усовершенствованная методика выделения ДНК и мультиплексная реакция. В одной пробирке одновременно, независимо друг от друга идут три реакции:

1 реакция - для определения терминатора NOS бактерий *Agrobacterium tumefaciens*. Этот участок используется в генно-инженерных конструкциях, предназначенных для получения трансгенных растений.

Используемый гибридационный зонд метили флуоресцентным красителем FAM, в качестве флуоресцентного тушителя использовали BHQ1.

2 реакция - для определения промотора 35S вируса мозаики цветной капусты. Этот ген применяется в генно-инженерных конструкциях, предназначенных для получения трансгенных растений. Используемый гибридационный зонд метили флуоресцентным красителем ROX, в качестве флуоресцентного тушителя использовали BHQ2.

3 реакция - внутреннего положительного контроля, для исключения ложноотрицательных результатов. Используемый гибридационный зонд метили флуоресцентным красителем Cy5, в качестве флуоресцентного тушителя использовали BHQ3.

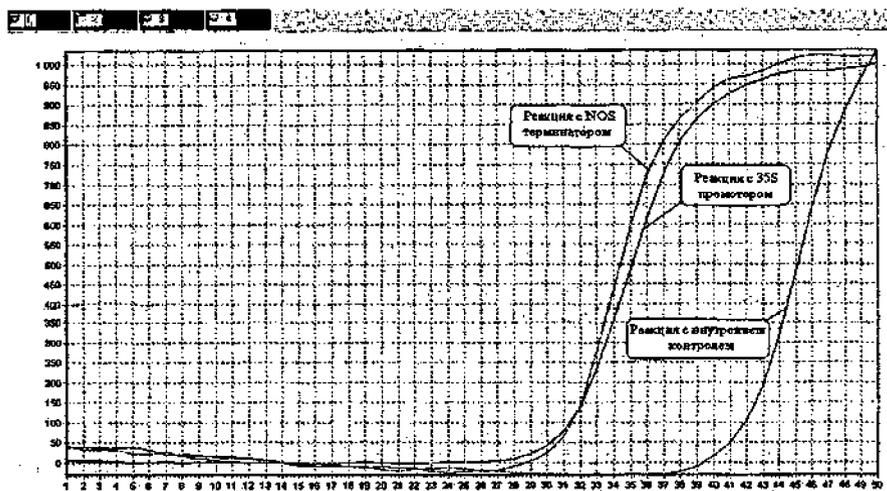


Рисунок 1. Результаты качественного определения ГМИ на основе ПЦР в реальном времени.

2.2.5. Совершенствование методики количественного определения ГМИ на основе ПЦР в реальном времени.

В случае обнаружения в образце генов вставки 35S промотор, NOS терминатор и Лес лектина, проводили количественную оценку и идентификацию трансгенной ДНК сои линии 40-3-2, устойчивой к

глифосату. Для этого была усовершенствована методика количественного анализа ГМИ.

В количественной методике также используется усовершенствованная пробоподготовка и мультиплексная реакция. В одной пробирке одновременно, независимо друг от друга идут две реакции:

1 реакция - ген лектина, присутствующий как в ГМ так и в обычной сое. Используемый гибридизационный зонд метили флуоресцентным красителем R6G, в качестве флуоресцентного тушителя использовали BHQ2.

2 реакция - фрагмент ДНК, специфичный для сои Roundup Ready линии GTS 40-3-2. Используемый гибридизационный зонд метили флуоресцентным красителем ROX, в качестве флуоресцентного тушителя использовали BHQ2.

Результаты анализа представлены на рисунке 2.

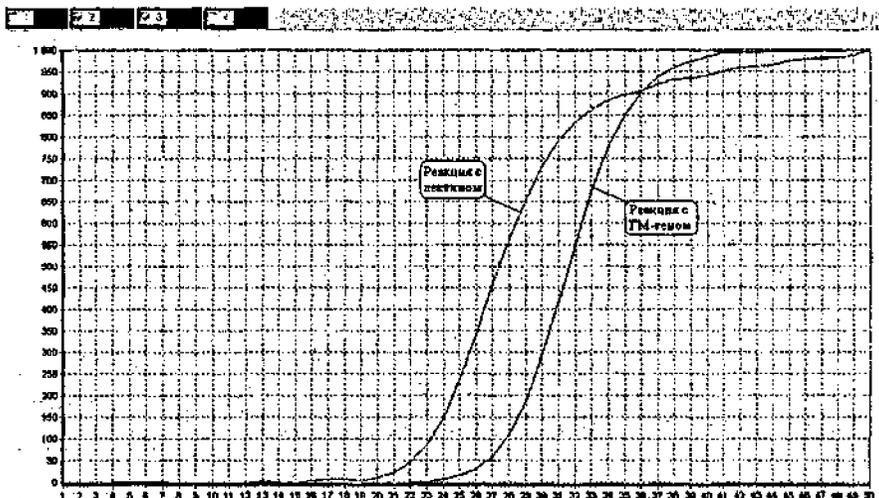


Рисунок 2. Результаты количественного определения ГМИ сои на основе ПЦР в реальном времени.

В случае обнаружения в образце генов вставки 35 S промотор, NOS терминатор и крахмальной синтазы SSIIb, проводили идентификацию и количественную оценку трансгенной ДНК по кукурузе линии MON 810,

устойчивой к стеблевому мотыльку. Для этого была усовершенствована методика количественного анализа ГМИ.

В количественной методике также используется усовершенствованная пробоподготовка и мультиплексная реакция. В одной пробирке одновременно, независимо друг от друга идут две реакции:

1 реакция - ген крахмальной синтазы *SSI1b* кукурузы, который присутствует как в трансгенной, так и в обычной кукурузе. Используемый гибридизационный зонд метили флуоресцентным красителем R6G, в качестве флуоресцентного тушителя использовали ВНQ2.

2 реакция - ген специфичный для кукурузы линии MON 810. Используемый гибридизационный зонд метили флуоресцентным красителем ROX, в качестве флуоресцентного тушителя использовали ВНQ2.

Результаты анализа представлены на рисунке 3.

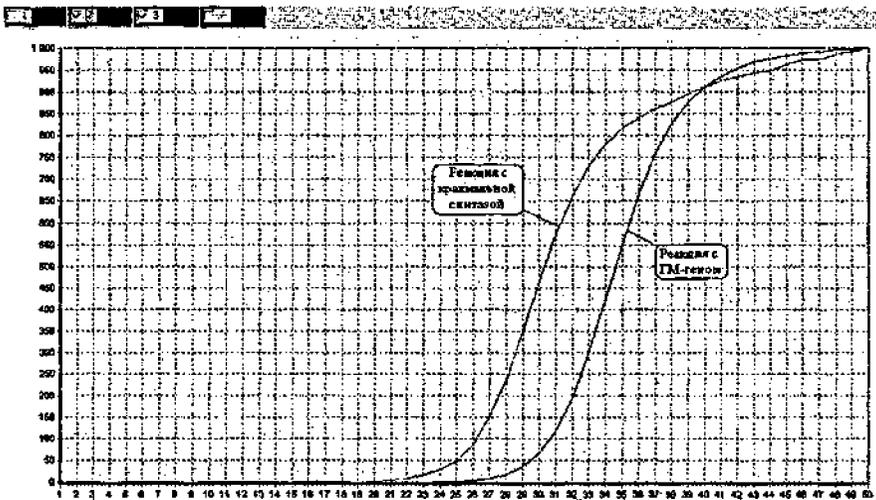


Рисунок 3. Результаты количественного определения ГМИ кукурузы на основе ПЦР в реальном времени.

Результаты анализа представленные на рисунке 2,3 позволяют говорить о положительной динамике хода ПЦР в реальном времени для образца содержащего ГМИ.

2.2.6 Проведение мониторинговых исследований по выявлению фальсифицирующих примесей.

За время исследований были проведены мониторинговые исследования 110 образцов различных продуктов питания и пищевого сырья (колбас, сосисок, консервов, пельменей, муки и крупяных изделий, молочных продуктов, овощей, жировых растительных продуктов и прочих (рисунок 4)).

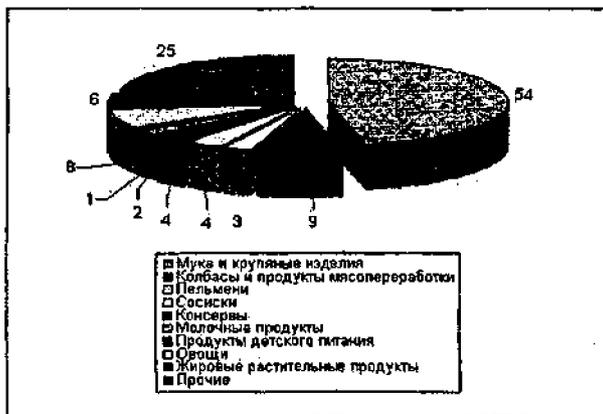


Рисунок 4. Проанализированная продукция.

Мониторинг исследуемой продукции показал возможность применения разработанных методик для качественного и количественного определения недеklarированных компонентов из ГМИ в продуктах животного и растительного происхождения.

ВЫВОДЫ

1. Разработанные модифицированные высокоэффективные методики выделения ДНК с использованием ионного детергента СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), а также с использованием сорбента Silica (SiO_2), позволяют получать свободную от ингибирующих примесей ДНК и ускоряют время выделения ДНК в 1,5-2 раза.

2. Предложенные методики используются для экстракции и очистки ДНК как однокомпонентных, так и многокомпонентных смесей животного и

2. Предложенные методики используются для экстракции и очистки ДНК как однокомпонентных, так и многокомпонентных смесей животного и растительного происхождения в целях последующего качественного и количественного анализа.

3. Усовершенствованные методики качественного определения ГМИ (соя и кукурузы), включающие экспрессное выделение ДНК с использованием сорбента Silica (SiO_2) или ионного детергента СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), постановку ПЦР с использованием праймеров на лектин и крахмальную синтазу и последующим электрофоретическим разделением ампликонов, ускоряют определение ГМИ в продуктах растительного и животного происхождения.

4. Разработанная модифицированная методика с использованием 35S-промотора, NOS-терминатора и внутреннего положительного контроля в одной реакционной смеси, включающая ускоренную пробоподготовку и оценку результатов на основе ПЦР в реальном времени, сокращают время качественного определения ГМИ в продуктах растительного и животного происхождения до 4 часов.

5. Модифицированные методики количественного определения ГМИ на основе ПЦР в реальном времени (соя Roundup Ready линии GTS 40-3-2, кукурузы линии MON 810), высоко специфичны и позволяют обнаруживать в образце ГМИ менее 0,1 % как в сырье, так и в продуктах питания, в том числе термообработанных.

6. Разработанные методики определения и идентификации ГМИ по основным характеристикам не уступают зарубежным аналогам, имеют более низкую стоимость и сокращают время анализа в 1,5-2 раза.

7. Проведенные мониторинговые исследования продукции животного и растительного происхождения с использованием разработанных методик показали возможность их использования для скрининговых и количественных тестов выявления недекларированных ГМИ в продуктах животного и растительного происхождения.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

Для использования в научных учреждениях и исследовательских лабораториях могут быть рекомендованы разработанные нами:

- Методические рекомендации "Качественное определение ГМИ в продуктах, содержащих компоненты животного и растительного происхождения" (утверждены отделением ветеринарной медицины РАСХН 20.10.2006 г.)

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Е.А. Горобчук, С.А. Маргиева, В.И. Родин, Н.Г. Хомснец, А.В. Каверин, В.В. Светличкин, Д.Г. Узуян. /Оценка безопасности и качества сырья и продуктов животного происхождения на основе ДНК-диагностики.// Материалы 5-ой Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции", МГУПБ, Москва, 2004, стр. 45-46.

2. Каверин А.В. / Количественное определение ГМИ методом ПЦР в реальном времени// Труды ВНИИВСГЭ "Проблемы ветеринарной санитарии и экологии", Москва, 2006, стр. 34-37

3. Каверин А.В., Рошупкина Л.В., Горожанина Е.С., Бутко М.П./ Тестирование сои в стерилизованных консервах на основе ПЦР, ДНК-гибридизации и ИФА.// Материалы 5-ой международной научной конференции "Живые системы и биологическая безопасность населения", МГУПБ, Москва 2006, стр. 42-47

4. Каверин А.В., Рошупкина Л.В., Горожанина Е.С., Галкин А.В./ Использование метода ПЦР в экспертизе пищевых продуктов для видовой идентификации сырья животного происхождения.// Материалы 5-ой международной научной конференции "Живые системы и биологическая безопасность населения", МГУПБ, Москва 2006, стр. 48-52

5. Ивановцев В.В., Светличкин В.В., Каверин А.В. / Идентификация трансгенной сои в продуктах и кормах.// Журнал "Ветеринария и кормление", Москва 2006, №6 стр. 21-22

ВНИИВСГЭ. г. Москва, Звенигородское шоссе, 5

Заказ 212/7. Тираж 100 экз.