

УДК 579.69

ВАЛИДИЗАЦИЯ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО СЫРЬЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Журба Р. Г.¹, Журба А. Г.², Симчук А. П.³

¹ГП «Крымстандартметрология», Симферополь, razvitie@kdst.crimea.ua

²Седьмая городская больница, Симферополь

³Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, ecology@crimea.edu

В работе описан метод универсального количественного определения ГМО на основе мультиплексной тест-системы, проведена оценка воспроизводимости метода, предложены способы расчета по методу и возможные области применения.

Ключевые слова: генетически модифицированные растения, количественное определение ГМО.

ВВЕДЕНИЕ

Для маркировки продуктов питания с ГМ производными необходимо проведение количественного анализа. Международные стандарты описывают методы количественного определения различных линий сои и кукурузы [1]. Но кроме сои и кукурузы в мире зарегистрировано около сотни других видов генномодифицированных растений [2]. В России из 12 зарегистрированных линий ГМО 9 линий сои и кукурузы. По данным на 2004 год из 93 линий ГМО, выпускаемых в промышленных масштабах ГМО, соя и кукуруза составляют лишь 25 линий [3]. В связи с этим возникает необходимость количественного определения других линий.

В данной работе представлен универсальный метод количественного определения изученных линий ГМ растений, содержащихся в продуктах питания с растительным компонентом одного вида на основе мультиплексной тест-системы, позволяющей анализировать данные как по *r35S*, так и по *tNOS*.

Такая универсальность метода позволяет сократить материальные расходы, затрачиваемые на постановку калибровочных образцов, а также дает возможность за одну постановку ПЦР проанализировать большее количество образцов и расширяет спектр возможных испытаний.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Анализ проводится по специфическому гену растений, который присутствует во всех растениях, промотору *r35S* вируса мозаики цветной капусты, и терминатору *tNOS T1* плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, которые присутствуют во многих промышленно выращиваемых ГМ растениях [4].

Выделение ДНК и проведение ПЦР. Выделение ДНК проводится с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-С».

В основе метода лежит тест-система «Растение/35S/NOS скрининг», разработанная ЗАО «Синтол» (кат. номер GM-411-RG4).

Обработка результатов. По кривой амплификации определяется пороговый цикл для каждой ПЦР (C_t). Рассчитывается разность между C_t для p35S или tNOS и C_t для гена, специфического для всех растений. Относительное количество рекомбинантной ДНК в пробе определяется по формуле:

$$w = 2^{-\left(\Delta C_{t_{sam}} - \Delta C_{t_{ref}}\right) \times c_{ref}}$$

где $\Delta C_{t_{sam}}$ – разность между значениями C_t для p35S или tNOS и гена, специфического для всех растений в исследуемом образце; $\Delta C_{t_{ref}}$ – разность между значениями C_t для p35S или tNOS и гена, специфического для всех растений в стандартном образце; c_{ref} – концентрация стандартного образца [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для валидации метода были проведены испытания на стандартных образцах сои и кукурузы. В таблице 1 представлены результаты испытаний.

Таблица 1

Результаты амплификаций по валидации метода

Калибровочные образцы	Анализируемые образцы	Анализируемая ГМ последовательность	Концентрация ГМ последовательности калибровочных (первая строка) и анализируемых образцов, %			
			0,5	1	2	5
Соя GTS 40-3-2	Соя GTS 40-3-2	промотор p35S	0,57	0,85		5,17
		терминатор tNOS	0,59	0,82		5,15
	Кукуруза MON810	промотор p35S	0,25	0,56	1,16	3,04
		терминатор tNOS	0,05	0,03	0,08	0,24
Кукуруза MON810	Соя GTS 40-3-2	промотор p35S	0,92	1,70	3,48	7,94
		терминатор tNOS	8,91	18,37	21,46	51,58
	Кукуруза MON810	промотор p35S	0,47	1,12		4,80
		терминатор tNOS	0,54	0,91		5,11

Среднее отклонение для 1% стандартного образца составило 0,083, что свидетельствует о высокой воспроизводимости.

Как видно из таблицы 1, при анализе образцов, отличных по линии от стандартных образцов, результаты не совпадают с ожидаемыми, но пропорциональны им. Вероятно, это связано с различной концентрацией целевых последовательностей в геномах различных линий. Например, если калибровочные образцы гаплоидны по модификации, а образцы диплоидны, то результат будет завышен вдвое.

Для проведения испытаний таких образцов можно использовать следующий способ расчетов:

$$w = 2^{-\left(\Delta C_{t_{sam}} - \Delta C_{t_{ref}} + \log \frac{a}{b}\right) \times c_{ref}}$$

где ΔCt_{sam} – разность между значениями пороговых циклов для р35S или tNOS и гена, специфического для всех растений в исследуемом образце; ΔCt_{ref} – разность между значениями пороговых циклов для р35S или tNOS и гена, специфического для всех растений в стандартном образце; c_{ref} – концентрация стандартного образца; – отношение количества ГМ последовательностей в одном геноме линии исследуемого образца к количеству ГМ последовательностей в одном геноме калибровочных образцов.

Также можно использовать метод калибровочных прямых, прибавив к разнице циклов поправочный коэффициент следующим образом:

$$\Delta Ct + \log \frac{a}{b},$$

где ΔCt – разность между значениями пороговых циклов для р35S или tNOS и гена, специфического для всех растений в стандартном образце; $\log a/b$ – отношение количества ГМ последовательностей в одном геноме линии исследуемого образца к количеству ГМ последовательностей в одном геноме калибровочных образцов.

В таблице 2 приведены результаты такого способа расчета для данных для анализа кукурузы линии MON810 с помощью калибровочных образцов сои линии GTS 40-3-2 (поправочный коэффициент составил 4,21).

Таблица 2

Результаты расчета концентрации стандартных образцов кукурузы с использованием поправочного коэффициента

Наименование пробирки	Исходные данные по ΔCt	Значение ΔCt с учетом поправочного коэффициента	% ГМИ
K05	14,50	18,71	0,54
K1	13,29	17,50	1,39
K2	13,03	17,24	1,71
K5	11,56	15,78	5,40
K*05	18,21		0,80
K*1	17,65		1,24
K*2	16,87		2,30
K*5	15,52		6,65

Примечание к таблице: перерасчет данных сделан с учетом отношения количества последовательностей tNOS в калибровочных и испытуемых образцах. К – калибровочные образцы сои; К* – стандартные образцы кукурузы (цифрой после К и К* показывается концентрация образца в %).

ВЫВОДЫ

1. Данный метод применим для проведения количественного испытания образцов пищевой продукции и сырья на наличие ГМО, содержащих растительный компонент одного вида с использованием калибровочных образцов этой же линии и обладает достаточно высокой воспроизводимостью (среднее отклонение для 1% стандартного образца составило 0,083).

2. При проведении анализа линий ГМО, отличных от используемых калибровочных образцов, необходимо учитывать соотношение последовательностей r35S и tNOS в линиях.

3. Расхождение результатов по последовательностям r35S и tNOS и может свидетельствовать о наличии в образце дополнительной линии ГМО и может быть использовано для оценки чистоты линии ГМО в образце. Методы для определения чистоты линии еще не разработаны, а выявление какой-либо линии ГМО в образце не может свидетельствовать об отсутствии других линий.

4. Такой метод оценки чистоты линий может быть применим и для определения чистоты линий в образцах пищевой продукции и сырья, содержащих растительные компоненты нескольких видов.

Список литературы

1. ДСТУ ISO 21570:2008 «Продукты питания. Методы анализа для выявления генетически модифицированных организмов и их производных. Количественный метод на основе анализа нуклеиновой кислоты».
2. Постановление главного санитарного врача от 14 ноября 2001 г. №36 «О введении в действие санитарных правил» (с изм. и доп. от 31 мая 2002 г.).
3. МУ 2.3.2.1917-04 Пищевые продукты и пищевые добавки. Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически модифицированные аналоги. Приложение 3.
4. ДСТУ ISO 21569:2008 Продукти харчові. Методи аналізування для виявлення генетично модифікованих організмів та їхніх похідних. Кількісний метод на основі аналізу нуклеїнової кислоти, Київ Держспоживстандарт України, 2009. – С. 18, 24.
5. МУК 4.2.2304-07 Методы идентификации и количественного определения генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения.

Журба Р. Г., Журба А. Г., Симчук А. П. Валідація методу кількісного виявлення генетично модифікованої сировини рослинного походження // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2011. Вип. 4. С. 112–115.

У статті розглянуто метод універсального вимірювання кількості ГМО із застосуванням мультиплексної тест-системи, проведено оцінювання надійності методу, запропоновано способи обчислення методу і можливі області застосування.

Ключові слова: генетично модифіковані рослини, кількісне визначення ГМО.

Zhurba R. G., Zhurba A. G., Simchuk A. P. Validation of the method for quantitative detection of the genetically modified materials from plants // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2011. Iss. 4. P. 112–115.

In the article the method of universal quantification of GMO on the basis of multiplex test systems was described, the estimation of reproducibility of the method was conducted, ways of calculation and possible areas of application were proposed

Key words: genetically modified plants, quantitatively detection of GMO.

Поступила в редакцію 13.10.2011 г.