

УДК 577; 57.088.1

**МЕТОДИ ВІДБОРУ ПРОБ І ПІДГОТОВКИ ЗРАЗКІВ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ТА
ВИЗНАЧЕННЯ ГМО У СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ РОСЛИНАХ І
ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ, ВИРОБЛЕНИХ ІЗ НИХ**

В. І. КОРХОВИЙ, кандидат біологічних наук

А. І. ЄМЕЦЬ, доктор біологічних наук, професор

В. Ю. ЯЦИШИН, кандидат біологічних наук

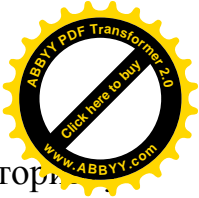
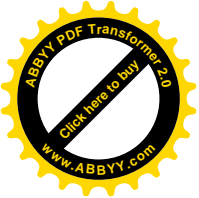
*Державна установа «Інститут харчової біотехнології та
геноміки НАН України»*

E-mail: korkhovy_v@ukr.net

***Анотація.** Стрімкий ріст кількості генетично модифікованих рослин і значні обсяги розширення площ їх вирощування вимагають розвиненої системи моніторингу. В статті висвітлено загальні принципи перших кроків підготовки зразків для детекції ГМ подій - етапи відбору проб та виділення ДНК.*

***Ключові слова:** генетично модифіковані рослини, відбір проб, виділення ДНК*

З моменту вивільнення генетично модифікованих (ГМ) рослин в навколишнє середовище та їх вирощування в комерційних масштабах минуло майже 20 років. З того часу відбувається збільшення як кількості різних ГМ сільськогосподарських культур, так і площ, на яких вони вирощуються. Так, на кінець 2014 року загальна площа, на якій вирощували отримані за допомогою методів біотехнології рослин становила 181,5 млн га в 28 країнах світу, або ж збільшилась більш ніж в 100 разів – з 1,7 млн га в 1996 році до майже 182 млн у 2014 році) [13]. Незважаючи на досить значну кількість отриманих ГМ рослин - на кінець жовтня 2015 в базі даних International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) зареєстровано 384 ГМ події, в сільськогосподарському виробництві використовують лише невелику їх частину, а саме: сою, бавовну, кукурудзу та ріпак, які займають основну площу культивованих ГМ культур –99,6 % [14]. Згідно законодавства багатьох країн необхідно маркувати продукцію в якій можуть бути присутніми генетично



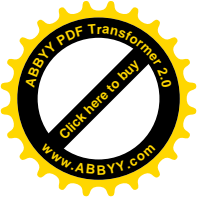
змінені елементи, що в свою чергу вимагає відповідної системи моніторингу для відстеження таких ГМ подій. Паралельно з отриманням тієї чи іншої ГМ культури розробляються і методи її детекції. Однак, часто для виявлення ГМО у продуктах харчування, вироблених з таких рослин, чи насіння, розроблених методів недостатньо. Це пояснюється тим, що під час виробництва харчових продуктів сировина піддається різним способам переробки, що в подальшому ускладнює виявлення ГМ подій. Важливими кроками в детекції ГМО є етапи відбору проб та виділення ДНК.

Відбір зразків – розмір зразка, гомогенізація зразка та порогова межа

В Європі і США було розроблено вимоги щодо інструкцій відбирання зразків для тестування ГМО, які згодом, пройшовши ряд апробацій і коригувань були покладені в основу прийнятого та затвердженого в багатьох країнах Євросоюзу міжнародного стандарту CEN/TS 15568:2006. Цей стандарт незабаром було перекладено українською мовою і затверджено як Національний стандарт України ДСТУ-П CEN/TS 15568:2008.

Однією з основних вимог до відібраного зразка є те, що він повинен бути типовим за відношенням до партії/множини продуктів з яких його було відібрано. В той же час план відбору зразка і його розміри повинні відповідати статистичним вимогам щодо гетерогенності та порогового ліміту, за яких результат буде достовірним. Виходячи з цього, план відбору зразка повинен гарантувати з одного боку, що польовий зразок було відібрано у статистично типовий спосіб і, що особливо важливо, стан гетерогенності зразка. Його розмір повинен бути достатнім, щоб забезпечити надійну детекцію за бажаної чутливості. Репрезентативність зразка має зберігатись протягом переходу польового зразка в лабораторний чи тестовий зразок. В статті Anklam et al. [1] акцентується увага на тому, що варіабельність зразка (часто описується як гетерогенність), а також застосований план відбору зразків залежить від типу матеріалу, що буде аналізуватись.

1. Сировина часто не систематично змішується протягом збирання урожаю, його зберігання тощо, в результаті у шарах це може суттєво



порушувати достовірність висновків, що пов'язано із випадковим відбиранням зразка.

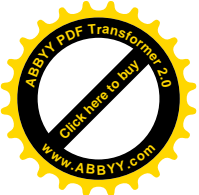
2. Компоненти піддаються переробці і, таким чином, вже демонструють обмежений ступінь вибіркової, оскільки різні партії також можуть мати різні характеристики.
3. Оброблені продукти харчування можуть містити ГМ матеріал лише як джерело одного або декількох компонентів, через це, у багатьох випадках спостерігається розшарування за розподілом варіант. Однак в межах кожного компонента обробленого продукту варіабельність буде низькою.

Чим вищий ступінь гетерогенності, тим більш критичним буде вибір відповідного плану відбирання зразків. Більше того, коли лише низькі рівні ГМО є прийнятними, дозволений розмір зразка буде збільшуватись, щоб бути репрезентативним. Для відбирання зразків продовольчих товарів наявна практика із застосуванням добре досліджених зразкових рослин для вирішення аналогічних завдань детектування [2, 8].

Згідно формули (розроблена для однокрокової процедури відбору зразків та кількісного аналітичного тестування):

$$n = \log(1 - (G/100)) / \log(1 - (P/100)),$$

де: n – розмір зразка (кількість зернин), G – можливість відхилення концентрацій у серії, P – відсоткова концентрація у серії, розмір зразка може становити 299 зернин або бобів, щоб отримати 95 % вірогідності відбраковки серій з 1 % концентрацією ГМО, тобто «ризик покупця» отримати більше 1 % ГМО вмісту становить 5 % [12]. Якщо порогова межа встановлено як 0,5 % ГМО за 95 % вірогідності відбраковки, розмір вибірки повинен збільшитись до понад 598 зерен. Однак за розміру зразка 299 зерен «ризик продавця» отримати відбраковку партії, що містить лише 0,5 % ГМО становить близько 78 %. Отже, щоб забезпечити контроль ринкових ризиків як для покупця, так і для продавця, розроблено множинні плани відбору зразків [12, 17]. Множинний план відбору зразків визначається кількістю зразків що відібрані та протестовані,



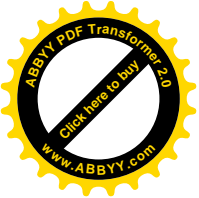
максимальною кількістю позитивних результатів, дозволених і прийнятних партій та кількістю зерен в кожному зразку. Покупець і продавець повинні дійти згоди у цих трьох значеннях і цим самим визначити для себе прийнятний маркетинговий ризик [12].

Окрім всього, інша рекомендація, застосовувана до кількісного аналітичного тестування частки ГМО зерна у партії описує різний розмір зразка, а саме Хюбнер та співавт. [9] вираховали, що для рівномірного розподілу розмір зразка, який перевіряється, повинен становити принаймні 3500 часточок при очікуваному вмісті ГМО в партії 1 %, в такому випадку достовірність становитиме 95 %, а відносна похибка відбору – менше 20 % (відповідно до коефіцієнта варіації 20 %). У випадку «гетерогенного розподілу ГМО частинок» розмір зразка зростає до 10000 часток. Різний розмір зразка тут відображає різні вимоги до якісного та кількісного тестування ГМО.

Підготовка зразка – виділення та очищення аналізів.

Зважаючи на досить значну стабільність молекули ДНК і чутливість методу детекції ДНК – полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), ДНК є найбільш підходящим аналітом для майже усіх видів зразка (сировина, компоненти, перетворювані продукти). Навіть малі аліквоти (100 мг), які є стандартними для найбільш поширеного методу виділення СТАВ були придатними для виділення ДНК із соєвих продуктів різної глибини переробки [15]. З використанням цього методу були отримані різні кількості - від 31 до 531 ng/μl ДНК, придатної для ПЛР аналізу. Вдосконалення методів виділення і розроблення методик дозволяє на сьогодні виділяти ДНК навіть з таких глибоко перероблених продуктів як рафінована соєва олія [5].

Якість та чистота зразка ДНК значною мірою впливають на ефективність ПЛР. Щодо якості ДНК - вона визначається довжиною фрагмента та ступенем його пошкодження в процесі нагрівання, низького рН та/або нуклеазами, що спричиняють гідроліз, депуринізацію та/або ензиматичну деградацію. Таким чином, якість ДНК варіює залежно від дослідного матеріалу, ступенів переробки зразка та застосованого методу виділення ДНК. Важливо зауважити,

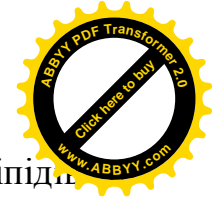
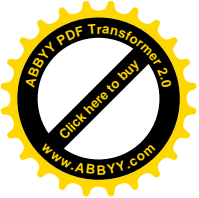


що ДНК, виділена із перероблених продуктів різними методами має до короткі цільові послідовності, наприклад 100-400 пар нуклеотидів для соєвого білка та перероблених томатних продуктів [10], або в іншому випадку 70-774 пар нуклеотидів [3]. Таким чином, потрібно здійснити вибір відповідних праймерів до отриманих коротких ампліконів.

На перебіг ПЛР можуть впливати різні забруднюючі речовини, які можуть походити з дослідного матеріалу, наприклад полісахариди, ліпіди та поліфеноли. На чистоту ДНК можуть негативно впливати різні контамінації харчових матриць [19]. Забруднюючі речовини можуть походити або з реактивів для виділення ДНК, як це було описано для цетилтриметиламонійброміду (СТАВ) або гексадецилтриметиламонійброміду, ROSE та лужного методу. Наприклад, Таq-полімераза, ключовий фермент у ПЛР, інгібується полісахаридами, ЕДТА, фенолом, SDS тощо.

Для виділення ДНК наявно багато методів і багато із них було пристосовано для детекції ГМО в рослинному матеріалі та рослинній їжі [4, 6, 7, 11, 16, 18, 19]. Загалом, виділення ДНК з рослинного матеріалу повинно відбуватись за наступним планом :

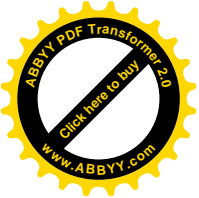
1. Руйнування клітинних стінок, що зазвичай досягається розтиранням тканин у сухому льоді або рідкому азоті.
2. Руйнування клітинних мембран досягається за допомогою детергентів (СТАВ чи SDS), які є (як і ЕДТА та забуферені солі як Трис- HCl) необхідним компонентом буферу для виділення ДНК.
3. а) інактивація ендогенних нуклеаз досягається додаванням детергентів та ЕДТА, які зв'язують Mg^{2+} , облігатний кофактор багатьох ферментів.
б) Протеїназа К може додаватись для інактивації та деградації білків, зокрема, в протоколах, використовуючи ДНК-зв'язуючі колонки із силікою.
4. Відділення інгібуючих полісахаридів здійснюється з використанням принципу різної розчинності полісахаридів та ДНК у присутності СТАВ.



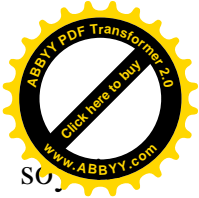
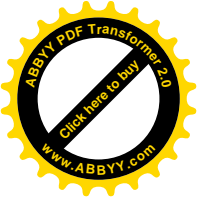
5. Відділення гідрофобних клітинних компонентів, наприклад ліпідів та поліфенолів досягається екстракцією із органічним розчинником типу хлороформу.
6. Врешті, відділення від детергента та концентрування ДНК досягається спиртово-сольовим осадженням.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Anklam E. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products / E. Anklam, F. Gadani, P. H. N. Pijnenburg, G. V. D. Eede // *Eur Food Res Technol.* – 2002. - № 214. – P. 3–26.
2. Berger B. Pesticide residues in products of plant origin in the European Union. Sampling strategy and results from the co-ordinated EU monitoring programmes in 1996 and 1997 / B. Berger, C. von Holst // *Environ Sci Pollut Res Int* - 2001. - 8(2): 109-12.
3. Bernardo G. Di. Comparative Evaluation of Different DNA Extraction Procedures from Food Samples / G. Di Bernardo, S. Del Gaudio, U. Galderisi, A. Cascino, M. Cipollaro // *Biotechnol. Prog.* – 2007 - № 23 –P. 297-301.
4. Branquinho M. R. Use of real-time PCR to evaluate two DNA extraction methods from food / M. R. Branquinho, R. T. B. Ferreira, P. Cardarelli-Leite // *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* – 2012. - № 32(1) – P. 112-118.
5. Costa J. Detection of genetically modified soybean DNA in refined vegetable oils / J. Costa, I. Mafra, J. S. Amaral, M. B. P. P. Oliveira // *Eur Food Res Technol.* – 2010. - № 230. – P. 915–923.
6. Cankar K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms / K. Cankar, D. Štebih, T. Dreo, J. Žel, K. Gruden // *BMC Biotechnology.* – 2006. - №6. –P. 37.
7. Datukishvili N. Comparative evaluation of DNA extraction methods for food crops / N. Datukishvili, I. Gabriadze, T. Kutateladze, M. Karseladze, B. Vishnepolsky //



- International Journal of Food Science and Technology. – 2010. № 45. – P. 1320.
8. Gilbert J. Sampling of raw materials and processed foods for the presence of GMOs / J. Gilbert // Food Control/ - 1999. - №10. - P. 363-365.
 9. Hübner P. Validation of PCR Methods for Quantitation of Genetically Modified Plants in Food. / P. Hübner, H.-U. Waiblinger, P. Klaus, P. Brodmann // Journal of AOAC International/ - 2001/- № 6. - P. 1855-1864.
 10. Hemmer W. Foods derived from genetically modified organisms and detection methods., Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland. BATS-Report 2/1997. – 1997.
 11. Hupfer C. The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize / C. Hupfer, J. Mayer, H. Hotzel, K.Sachse, K.H. Engel // European Food Research and Technology. - 1999. - №5. – P. 301-304.
 12. <http://www.gipsa.usda.gov/fgis/biotech/sample2.htm>
 13. James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014 Executive Summary brief 49.
 14. James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013, Executive Summary brief 46.
 15. Mandaci M., Çakir Ö., Turgut-Kara N., Meriç S., Ari Ş. Detection of genetically modified organisms in soy products sold in Turkish market. Food Sci. Technol, Campinas, 34(4): 717-722, Oct.-Dec. 2014
 16. Ovesná J. Detection of Transgenic Papaya Lines: Extraction Protocol Optimisation and Verification of DNA Quality by PCR Assay / J. Ovesná, J. Hodek / Czech J. Food Sci. -2009.- №2:.. – P.75–81.
 17. Remund K. Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits / K. Remund, D. Dixon, D. Wright, L. Holden // Seed Science Research. – 2001. - №11. - P 101 – 119.



18. Sönmezoğlu Ö. A. Determination of genetically modified corn and soya processed food products / Ö. A. Sönmezoğlu, H. Keskin // Journal of Applied Biology & Biotechnology. – 2015. - №3. – P.32-37.
19. Vroh Bi I. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction / Bi I. Vroh, L. Harvengt, A. Chandelier, G. Mergeai, P. Du Jardin // Plant Breeding . – 1996. - №115. – P.205–206.

**МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ И ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ
ДЕТЕКЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГМО В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
РАСТЕНИЯХ И ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, ПРОИЗВЕДЕННЫХ ИЗ НИХ**

В. И. Корховой, А. И. Емец, В. Ю. Яцишин

Аннотация. Стремительный рост количества генетически модифицированных растений и значительные объемы расширения площадей выращивания требуют адекватной системы мониторинга. В статье отображены общие принципы первых шагов подготовки образцов для детекции ГМ – этапы отбора проб и выделения ДНК

Ключевые слова: генетически модифицированные растения, отбор проб, выделение ДНК

**METHODS OF SAMPLING AND SAMPLE PREPARATION FOR
DETECTION AND IDENTIFICATION OF GMO IN AGRICULTURAL
PLANTS AND FOODS PRODUCTS**

V. Korkhovoy, A. Yemets, V. Yatsyshyn

Abstract. The rapid growth in the number of genetically modified plants, and significant amounts of expansion of cultivation areas require adequate monitoring system. The article reflects the general principles of the first steps of preparation of samples for the detection of GM - stages of sampling and DNA extraction

Key words: genetically modified plants, sampling, DNA extraction