

УДК 604.6.001.11:633.002.6

ГАЙДЕЙ О.С., канд. вет. наук, e-mail: olga.gaidei@gmail.com

ЗАГРЕБЕЛЬНИЙ В.О., канд. вет. наук, e-mail: zvo1@i.ua

НОВОЖИЦЬКА Ю.М., канд. вет. наук, e-mail: julia@vetlabresearch.gov.ua

УСАЧЕНКО Н.В., e-mail: nataliia.usachenko@gmail.com

ДАНИЛЬЧЕНКО Н.Л., e-mail: danilchenko_nata@mail.ru

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНІ ВИМОГИ ДО ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ НА НАЯВНІСТЬ ГМО МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНО- ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ (ОГЛЯДОВА СТАТТЯ)

У статті наведено перелік нормативних документів з питань ГМО, основних вимог до ПЛР-лабораторій та описано головні принципи проведення досліджень зразків на наявність ГМО методом полімеразно-ланцюгової реакції у режимі реального часу. Аналіз чинної нормативної документації з питань ГМО свідчить про відсутність на сьогодні в Україні чинних нормативних документів, які регламентують процедуру проведення відбору проб та пробопідготовки зразків (крім сої) для дослідження на наявність ГМО.

***Ключові слова:** ПЛР-лабораторія, генетично модифіковані організми, трансгенні рослини, біотехнологія, скринінг.*

Вступ. У системі лабораторного контролю трансгенних продуктів виділяють два напрямки: методи ДНК-діагностики та методи виявлення трансгенних білків на основі імунодіагностики [1, 2, 3].

На основі ДНК-діагностики (ПЛР, ПЛР у режимі «реального часу») визначають як конкретні вбудовані гени, так і регуляторні ділянки ДНК векторних конструкцій (35 S-промотор, NOS-термінатор). Імунологічні методи дозволяють визначити безпосередньо трансгенні білки. Вони ґрунтуються на утворенні стійкого комплексу молекули трансгенного білка (антигену) зі специфічними до нього антитілами. Науковий Центр Європейської Комісії оголосив метод полімеразно-ланцюгової реакції у якості стандартного, оскільки одним із недоліків імуноферментного аналізу (ІФА) є низька ефективність при дослідженні продуктів, що підлягали технологічній обробці, яка викликає практично повну денатурацію молекул ДНК [1, 3, 4].

Метою роботи було здійснити аналіз вітчизняних нормативних документів, які регламентують вимоги до ПЛР-лабораторій та принципів проведення досліджень зразків на наявність ГМО методом полімеразно-ланцюгової реакції у режимі реального часу.

Матеріали і методи досліджень. Проаналізовано літературні джерела та інтернет-ресурси, які регламентують вимоги до ПЛР-лабораторій та принципи проведення досліджень зразків на наявність ГМО методом полімеразно-ланцюгової реакції у режимі реального часу.

Результати досліджень. Організація роботи ПЛР-лабораторій в Україні здійснюється згідно Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I–IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» (Наказ Міністерства охорони здоров'я № 26 від 24.01.2008 р.), які встановлюють вимоги до приміщень лабораторій і порядку організації і проведення в них робіт [5].

Нами встановлено, що дослідження з визначення ГМО в Україні регламентуються наступними нормативними документами:

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

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

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

ДСТУ ISO 21572:2006 Продукти харчові. Методи аналізу для визначення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів. Методи, які ґрунтуються на аналізі білків.

ДСТУ ISO 24276:2008 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів та їх похідних. Основні вимоги і визначення.

ДСТУ ISO/TS 21098:2009 Харчові продукти. Методи аналізу по визначенню генетично модифікованих організмів та похідних продуктів, створені на основі аналізу нуклеїнових кислот. Доповнення до стандартів ISO 21569, ISO 21570, ISO 21571, IDT.

ДСТУ 6056:2008 Буряки. Метод визначення живих змінених організмів у насінневому та рослинному матеріалі з використанням полімеразної ланцюгової реакції.

ДСТУ 5021:2008 Соя. Ідентифікація генетично модифікованих організмів. Ч.1. Методи відбирання та правила готування проб.

ДСТУ 5021:2008 Соя. Ідентифікація генетично модифікованих організмів. Ч.2. Метод визначення генетично модифікованих організмів.

Проведений аналіз літературних джерел вказує, що на сьогодні в Україні відсутні чинні нормативні документи, які регламентують процедуру проведення відбору проб різних видів продукції і сировини, крім сої, та пробопідготовки зразків для дослідження на наявність ГМО.

Проведення досліджень з визначення ГМО повинне включати наступні етапи:

1. Реєстрація зразків, пробопідготовка (гомогенізація, приготування наважки).

2. Виділення (екстракція) рослинної ДНК.
3. Приготування реакційної суміші (master-mix).
4. Ампліфікація.
5. Інтерпретація результатів.
6. Оформлення звіту про результати досліджень.

Зразки, які надходять на дослідження на наявність ГМО, після первинної реєстрації та присвоєння ідентифікаційних номерів у відділі прийому та реєстрації зразків переносяться у закритому контейнері в зону пробопідготовки.

Пробопідготовка досліджуваного зразка передбачає його подрібнення та гомогенізацію за допомогою спеціального лабораторного обладнання (блендер, гомогенізатор, ступка, млинок) та приготування наважки.

Досліджуваний зразок гомогенізується з використанням гомогенізатора: робляться три послідовні помолу, відбирається наважка, зважується від 50 до 200 мг зразка (залежно від вибору діагностичного набору для виділення рослинної ДНК) і поміщається у дві попередньо промарковані одноразові пластикові мікропробірки типу Еппендорф об'ємом 2,0 мл, обов'язково необхідно вказати реєстраційний код зразка, дату проведення випробування та підпис виконавця.

При дослідженні рідких та напіврідких матеріалів (соуси, пасти та ін.) вміст кожної упаковки ретельно перемішується за допомогою одноразового шпателя. Потім відбирається від 50 до 200 мкл досліджуваного зразка, (залежно від вибору діагностичного набору для виділення ДНК), переноситься у попередньо промарковані одноразові мікропробірки типу Еппендорф об'ємом 2,0 мл та ретельно перемішується (об'єднана проба).

При дослідженні матеріалів щільної консистенції (ковбаса, сир та ін.) відбираються наважки (по 5–10 г кожна), ретельно перемішуються одноразовим шпателем, формуючи об'єднану пробу (50–100 г). Перед проведенням досліджень проба подрібнюється за допомогою скальпеля, поміщається у гомогенізатор і гомогенізується. Для виділення ДНК використовується від 50 до 200 мг матеріалу.

Після закінчення процедури пробопідготовки мікропробірки з подрібненими зразками маркуються, поміщаються у закриті контейнери і передаються у кімнату для виділення нуклеїнових кислот, де й безпосередньо проводиться виділення (екстракція) рослинної ДНК, яка потім передається у закритих контейнерах через передаточне вікно у кімнату для проведення ампліфікації для проведення наступного етапу дослідження (внесення в реакційну суміш).

Після етапу виділення ДНК готується реакційна суміш (мастер-мікс) у кімнаті для приготування реакційної суміші. У даній кімнаті проводять лише приготування мастер-міксу (зона повністю вільна від нуклеїнових кислот). Пробірки з реакційною сумішшю передаються через передаточне вікно в кімнату для проведення ампліфікації, де вносять у реакційну суміш виділену ДНК зразків, контролю виділення, позитивний та негативний контролю з тест-систем, струшують на вортексі, осаджують центрифугуванням. Потім

переносять мікропробірки безпосередньо для проведення ампліфікації в термоциклер (ампліфікатор), програмують прилад. Після закінчення етапу ампліфікації проводять інтерпретацію результатів. Виділену ДНК зберігають у морозильній камері за температури мінус 20 °С.

У випадку, якщо в досліджуваному зразку не виявлено ДНК ГМ-рослин, оформлюється звіт, а досліджуваний зразок та виділена ДНК відправляється на утилізацію шляхом автоклавування.

Якщо у досліджуваному зразку виявлено ДНК ГМ-рослин, то далі проводиться ідентифікація ГМ-ліній та кількісне визначення ДНК ГМ-рослин. Після ідентифікації та встановлення кількісного вмісту ДНК ГМО, оформлюється звіт та утилізуються зразки та ДНК в автоклавній кімнаті. Послідовність проведення дослідження вказана на рисунку 1.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Діяльність лабораторій, що займаються визначенням ГМО в Україні є законодавчо врегульованою, але потребує вдосконалення шляхом розробки нормативних документів, які регламентують процедуру проведення відбору проб та пробопідготовки різних видів продукції та сировини (крім сої). Зазначені документи необхідно розробити та впровадити у практику.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Anderson K. GMOs Food Safety and Enviroment: What Role for trade Policy and the WTO? / К. Anderson, С. Nielsen // CIES Policy Discussion Papers. – 2000. – № 34. – 27 р.
2. Каверин А. В. Количественное определение ГМИ методом ПЦР в реальном времени / А. В. Каверин // Труды ВНИИВСГЭ "Проблемы ветеринарной санитарии и экологии", Москва, 2006 – с. 34 – 37.
3. Runge C. Labelling, Trade and Genetically Modified Organisms: A Proposed Solution / C. Runge, L. Jackson // Journal of World Trade. – 2000. – № 34 (1). – P. 111 – 122.
4. Caswell J. A. Labeling Policy for GMOs. To Each His Own? / Caswell .A. // AgBioForum. – 2000. – № 3(1). – P. 305 – 309.
5. Державні санітарні норми і правила «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» (Наказ Міністерства охорони здоров'я № 26 від 24.01.2008 р.).

НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ НА НАЛИЧИЕ ГМО МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ / Гайдей О.С., Загребельный В.А., Новожицкая Ю.Н., Усаченко Н.В., Данильченко Н.Л.

В статье приведены нормативные документы по вопросам ГМО, основные требования к ПЦР-лабораториям и принципы проведения исследований образцов на наличие ГМО методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Анализ действующей нормативной документации по вопросам ГМО, свидетельствует об отсутствии в Украине нормативных документов, которые регламентируют процедуру проведения отбора проб и пробоподготовки образцов (кроме сои) на наличие ГМО.

Ключевые слова: ПЦР-лаборатория, генетически модифицированные организмы, трансгенные растения, биотехнология, скрининг.

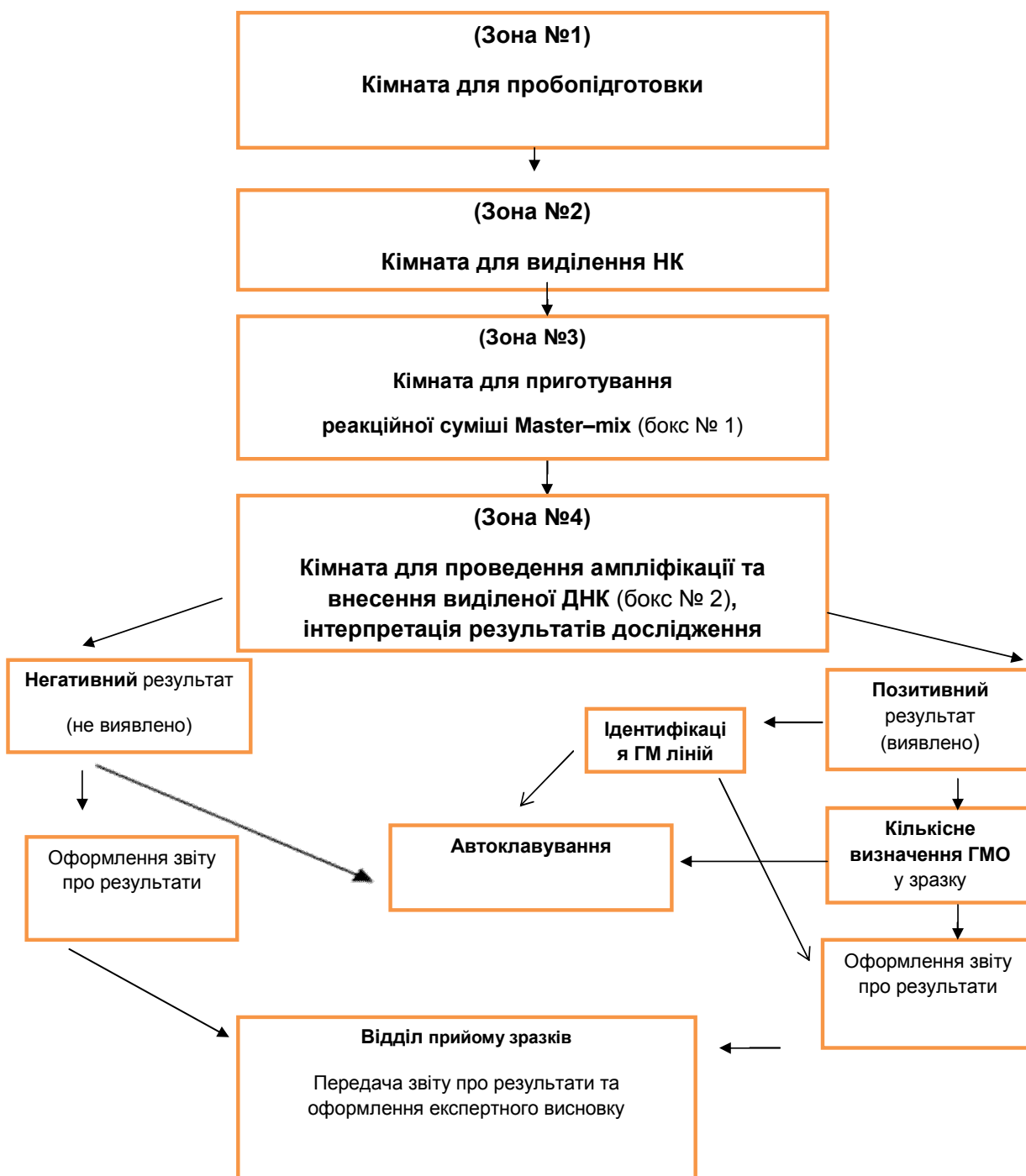


Рис. 1. Послідовність проведення досліджень з визначення ГМО методом полімеразно-ланцюгової реакції у режимі реального часу

REGULATORY-TECHNICAL REQUIREMENTS OF CONDUCT RESEARCH GMOs BY REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION / Haidei O.S., Zahrebelniy V.O., Novozhytska J.N., Usachenko N.V., Danilchenko N.L.

Introduction. *The article contains regulations on GMOs, the basic requirements for PCR laboratories and principles of the samples for the presence of GMOs by real time polymerase chain reaction.*

The DNA diagnostics (PCR, "real-time" PCR) is defined as specific tool for detection the target genes and regulatory regions of DNA (35 S-promoter, NOS-terminator). It also created the Immunological approaches to determine the specific transgenic proteins. They are based on the formation of a stable complex molecules transgenic protein (antigen) with specific antibodies. Scientific Centre of the European Commission announced the polymerase chain reaction (PCR) as the standard method for GMO detection.

The goal of the work. *To analyze the basic national normative documents regulating the requirements for PCR-laboratories and principles for detection of GMOs in the samples by real time polymerase chain reaction.*

Materials and methods of research. *Analyzed national normative documents and online resources regulating the requirements for PCR-laboratories and principles for detection of GMOs in the samples by real time polymerase chain reaction.*

Results of research and discussion. *Organization of the PCR-laboratory was performed under the State sanitary rules and regulations "Organization of the laboratories for testing materials that contains biological pathogenic agents of I-IV group of pathogens by molecular genetics methods" (Ministry of health protection of Ukraine №26 from 24.01.2008 y.) which stated the requirements for facilities and laboratories.*

Conclusions and prospects for further research. *Activities laboratories engaged in the definition of GMOs in Ukraine is legally regulated, but needs to be improved by developing normative documents, that regulate the procedure of sampling and samples preparation of various products and raw materials (except soybeans). These documents should be developed and implemented in practice.*

Keywords: *PCR-laboratory, genetically modified organisms, transgenic plants, biotechnology, screening.*

References

1. Anderson K. (2000) GMOs Food Safety and Enviroment: What Role for trade Policy and the WTO? / K. Anderson, C. Nielsen // CIES Policy Discussion Papers – № 34. – 27 p. [in English].
2. Kaverin A. V. (2006) Kolichestvennoe opredelenie GMI metodom PCR v real'nom vremeni [Quantitative determination of GMO by real-time PCR] Trudy VNIIVSHIE "Problemy veterinarnoi sanitarii i ekolohii", 34 – 37 [in Russian].
3. Runge C. (2000) Labelling, Trade and Genetically Modified Organisms: A Proposed Solution / C. Runge, L. Jackson // Journal of World Trade. – № 34 (1). – P. 111 – 122 [in English].
4. Caswell J. A. (2000) Labeling Policy for GMOs. To Each His Own? / Caswell .A. // AgBioForum. – № 3(1). – P. 305 – 309 [in English].
5. Derzhavni sanitarni normi i pravila «Orhanizaciia roboti laboratorii pri doslidzhenni materialu, shcho mistit' biolohichni patohenni ahenti I-IV hrup patohennosti molekuliarno-henetichnimi metodami» (Nakaz Ministerstva ohoroni zdorovia № 26 vid 24.01.2008 r.). [State sanitary rules and regulations "Organization of the laboratories in the study material that contains biological pathogenic agents of I-IV pathogenicity groups of molecular genetic methods" (24.01.2008 № 26)] [in Ukrainian].