

УДК 631.528.6 : 633.15

ПОДХОДЫ К ОБНАРУЖЕНИЮ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННОЙ КУКУРУЗЫ И ПРОВЕДЕНИЮ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКА CP4 EPSPS

¹З. Поповски, доктор аграрных наук

¹Э. Мискоска-Милевска, доктор сельскохозяйственных наук

¹Т. Несторовски, аспирант

²Е.В. Камалдинов, доктор биологических наук

²В.Л. Петухов, доктор биологических наук

¹Университет св. Кирилла и Мефодия, Скопье, Македония

²Новосибирский государственный аграрный университет

E-mail: vpetukhov@ngs.ru

Ключевые слова: генно-модифицированные организмы, кукуруза, белок, тест-полоска, ИФА

Реферат. Представлены результаты использования различных методов обнаружения генно-модифицированных организмов (ГМО) в пробах пищевых продуктов по уровню белка. В качестве исходного материала использованы семена генно-модифицированной кукурузы NK603 с разным содержанием ГМО, предоставленные Международной ассоциацией оценки семян (International Seed Testing Association - ISTA) в рамках программы оценки качества. Использовали специальные тест-полоски для проведения качественного и иммуноферментного анализа (ИФА) для полуколичественного определения, где в качестве мишени использовали молекулы CP4 EPSPS белка. Результаты исследований показали, что с использованием тест-полосок можно обнаружить присутствие 0,6% ГМО. Показано, что порог чувствительности тест-полосок обнаруживается при температурной обработке образцов при 80°C. Установленная линейная регрессионная зависимость служит доказательством применимости предлагаемого подхода и использования ИФА для полуколичественного определения ГМО по белку CP4 EPSPS в образцах, содержащих ГМ-кукурузу с концентрацией 0,1%. Отмечаются незначительные отличия при использовании фильтров с разными длинами волн.

Существующие методы определения ГМО базируются либо на обнаружении специфического белка, либо ДНК. Оба обозначенных подхода разрабатывались и применялись для выявления трансгенных культур и их производных [1–4]. Методы, основанные на определении какого-либо белка, базируются на иммунологическом принципе использования взаимодействия между антигеном и антителом [5, 6].

Существуют два подхода в иммунологическом анализе: иммуноферментный анализ (ИФА) и подход, основанный на использовании тест-полосок. ИФА является очень популярным и эффективным инструментом для экспресс-обнаружения определенного белка. Антитела помещают на твердую подложку, куда впоследствии добавляют образец, содержащий специфический белок. Если антиген присутствует в пробе, то образуется комплекс «антиген – антитело». Тест-полоски широко применяются для экспресс-тестирования образцов продукции сельского хозяйства на наличие трансгенных белков, однако их чувствительность

невысока. ИФА, в свою очередь, требует больше времени (несколько часов), более чувствителен и позволяет выявлять концентрации в диапазоне от 0,01–1,0%.

Более широкому применению методов, основанных на идентификации специфических белков при обнаружении ГМО, препятствуют два ограничения. Первое из них – это нестабильность белковых молекул, образуемых из трансгенов, и невозможность обнаружить их наличие в образцах, подвергаемых термической обработке [7], или присутствие и активность ряда протеаз [8]. Таким образом, они могут быть использованы только с целью исследования необработанного продовольственного сырья, кормов и семян. Второе ограничение связано со строгой специфичностью тестов в отношении оцениваемых белков и невозможностью идентифицировать более чем одну модификацию. ИФА – простой, надежный в использовании и дешёвый по сравнению с ДНК-методами подход. Тест-полоски подходят для качественного экспресс-анализа, тогда как ИФА может применяться

при полуколичественном определении. Методы, основанные на обнаружении специфического белка, как правило, менее чувствительны по сравнению с методами обнаружения ДНК.

Несмотря на меньшую надёжность таких методов, они могут быть использованы для быстрой проверки некоторых образцов, для того чтобы иметь представление об их составе и происхождении.

Методы обнаружения ДНК являются очень чувствительными и требуют тщательной пробоподготовки, необходимой для извлечения ДНК, свободной от ингибиторов, которые естественным образом присутствуют во многих пищевых продуктах. Высокая чувствительность ДНК-методов достигается путем увеличения числа копий специфических нуклеотидных последовательностей ДНК. Наиболее часто используемым методом ДНК-амплификации является полимеразная цепная реакция (ПЦР) [9]. В зависимости от того, какая последовательность ДНК представляет интерес для исследователя, метод может применяться как с целью простого мониторинга, так и в качестве более сложного комплексного или специфичного исследования, например, в программах секвенирования [10]. ДНК-диагностика может быть использована для сравнительного количественного определения [11, 12]. Как правило, она требует более высокого уровня профессионального мастерства и более дорогостоящего оборудования по сравнению с другими методами определения белков [13, 14].

Одним из важнейших вопросов представляется проблема выбора наиболее подходящего метода обнаружения ГМО в том или ином случае. К сожалению, невозможно создать единую таблицу с перечислением возможных видов исходных образцов, в том числе с высокой степенью их подготовки, и подходящий метод их исследования. Наряду с этим наблюдается увеличение количества различных ГМО, выращиваемых на коммерческой основе.

Учитывая перечисленные факторы, каждый образец нужно оценивать отдельно, что позволит определить наиболее подходящий метод исследования [15]. Для разработки и совершенствования методов анализа требуются стандартные образцы с известными концентрациями ГМО. Это необходимо для унификации применяемых подходов, где результаты приводятся в процентах [16].

Целью наших исследований явился сравнительный анализ чувствительности методов обнаружения ГМО на уровне белка с использованием тест-полосок и ИФА. Была поставлена задача с применением тест-полосок определить пределы обнаружения ГМО в термически обработанных

образцах пищевых продуктов, которые содержали ГМО в предельно допустимой для Евросоюза концентрации 0,9%. ИФА использован для создания калибровочной кривой как база для полуколичественного определения присутствия ГМО в низких концентрациях.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве исходного материала для тестирования была использована генетически модифицированная линия (ГМ) кукурузы NK 603 (содержание ГМ-кукурузы составляло 0,0; 0,1 и 0,6%). Исследования проводились в рамках аттестационных испытаний, осуществляемых Международной ассоциацией оценки семян (ISTA – International Seed Testing Association). Стандартные пробы с концентрациями 0,1 и 0,5% были приобретены у Joint Research Center – Institute for Reference Materials and Measurements (JRC–IRMM). В качестве материала для оценки чувствительности экспресс-метода использовали кукурузную пасту, специально приготовленную из муки с содержанием ГМ-кукурузы 0,6%. Впоследствии такую пасту подвергали термической обработке при 50, 100, 150, 200 и 250 °C. Вместе с этим исследовали пасту, которая выдерживалась при температуре 50, 60, 70, 80 и 90 °C. ИФА осуществлялся с ГМ-кукурузой в следующих концентрациях: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 и 0,8%.

С целью экспресс-определения присутствия белка CP4 EPSPS использовали тест-полоски (Agdia). Тест-полоски состояли из двух частей: нижняя служила для абсорбции белка, а верхняя пропитывалась антителами к лектину убиквитарного белка CP4 EPSPS [18, 19]. Проявление первой полоски означало то, что исследуемый образец был свободен от модификаций по гену CP4 EPSPS (отрицательный тест). Проявление двух полосок свидетельствовало о положительном результате теста. Если ни одной полоски не было видно, это могло быть следствием отсутствия тестируемого материала или повреждением самой тест-полоски [20].

Иммуноферментный анализ основан на подобном описанному ранее взаимодействию между целевым белком (CP4 EPSPS) и антителами к нему, которые в данном случае находились в лунках специального планшета. Образующийся комплекс белка и антитела впоследствии реагирует со вторым антителом, помеченным ферментом, при взаимодействии которого с соответствующим субстратом появляется окраска, интенсивность которой может быть оценена с использованием спектрофотометра при 630 и 650 нм [17]. В данном исследовании был

использован аналитический набор Pathoscreen для определения CP4 EPSPS (Agdia) в соответствии с рекомендациями производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сравнительный анализ образцов с концентрацией ГМ кукурузы NK603 0,0; 0,1 и 0,6% с использованием тест-полосок показал, что можно обнаружить ГМО в концентрации 0,6%, в то время как при концентрации 0,1% выявить ГМО не удалось. Полученные результаты согласуются с данными других исследований [21], где удавалось обнаружить одно генно-модифицированное семя кукурузы из 800 (~ 0,125%, рис. 1).

Влияние термической обработки на вероятность обнаружения ГМ кукурузы NK603 тест-полосками оценивалось с использованием теста, приготовленного из муки с концентрацией ГМ-кукурузы 0,6% (рис. 2).



Рис. 1. Обнаружение границ чувствительности тест-полосок для выявления ГМ-кукурузы NK603 (слева направо: 0,6% (А), 0,1% (В) и 0,0% (С))



Рис. 2. Изделия из теста, приготовленные из образцов ГМ-кукурузы NK603 с концентрацией 0,6% и подвергавшиеся термической обработке при 50 °С (А), 100 °С (В), 150 °С (С), 200 °С (D) и 250 °С (Е)

Положительные результаты были получены только по образцам, подвергавшимся термической обработке при 50 °С. Исследование оставшегося материала, полученного при более высоком температурном воздействии, привело к отрицательным результатам (рис. 3).

Принимая во внимание представленные ранее результаты, было проведено исследование, задачей которого являлся поиск границ определяемости (ГО) ГМ-кукурузы в исследуемых образцах, подвергавшихся термической обработке при 60, 70, 80 и 90 °С (рис. 4).

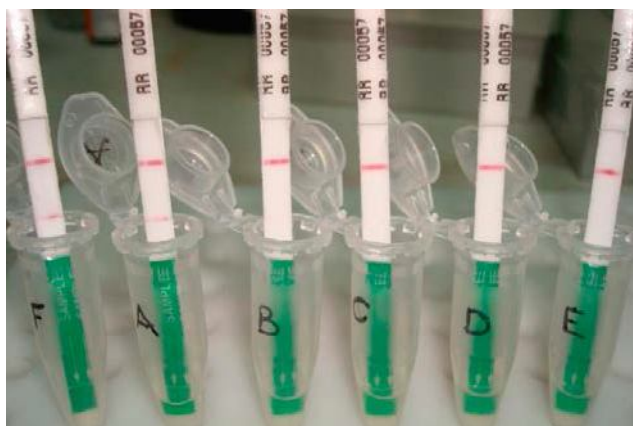


Рис. 3. Сравнение чувствительности тест-полосок к белку CP4 EPSPS, содержащемуся в образцах теста, приготовленного из ГМ-кукурузы NK603 с концентрацией 0,6% и испечённого при 50 °С (А), 100 °С (В), 150 °С (С), 200 °С (D), 250 °С (Е), а также без термической обработки (F)



Рис. 4. Сравнение чувствительности тест-полосок на наличие в образцах 0,6% NK603, термически обработанных при 60–90 °С

Результаты показали, что присутствие ГМ-кукурузы NK603 удалось установить в образцах, которые были термически обработаны в температурном диапазоне 60–80 °С. Особенно отчётливо определялись результаты тестирования образцов после воздействия температуры 60 °С, тогда как при 90 °С присутствие ГМ-кукурузы найти не удалось.

Следующим этапом было исследование образцов ГМ-кукурузы NK 603 с концентрациями 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 и 0,8% методом иммуноферментного анализа. Полученные в процессе тестирования результаты были измерены при длинах волн 630 и 650 нм (рис. 5).

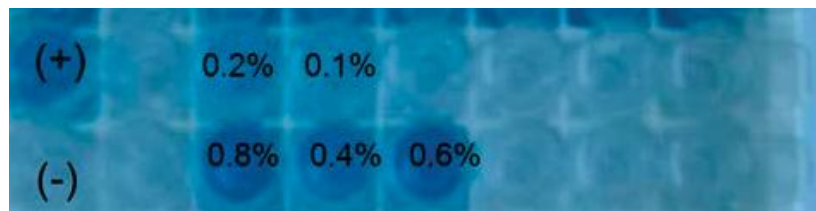


Рис. 5. Иммуноферментный анализ образцов на присутствие ГМ-кукурузы NK603 в концентрациях 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 и 0,8%

Для оценки применимости предлагаемого количественного анализа на практике методом линейной регрессии оценены калибровочные графики, построенные с помощью программного продукта Graphpad Prism (рис. 6).

На оси абсцисс откладывали концентрации NK603, на оси ординат показаны значения коэффициентов экстинкции при 630 и 650 нм.

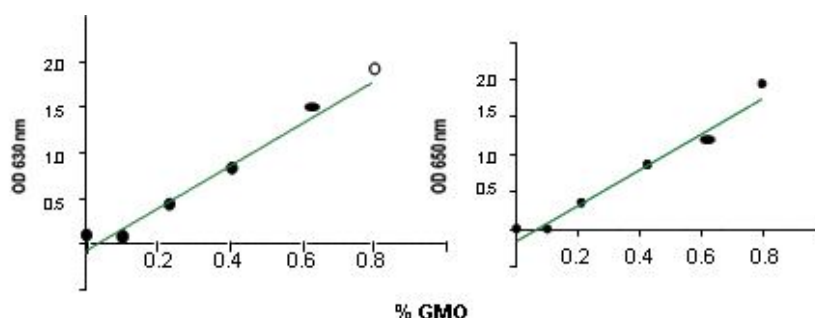


Рис. 6. Калибровочные графики, построенные при определении концентрации ГМ-кукурузы NK603 при длинах волн 630 и 650 нм

ВЫВОДЫ

1. С использованием тест-полосок можно определить присутствие ГМ-кукурузы при диапазоне температур 60–80 °С и концентрации 0,6%.

2. Полученные результаты показали незначительные отличия при использовании фильтров

с разными длинами волн. Установленная линейная регрессионная зависимость служит доказательством применимости предлагаемого подхода и ИФА для полуколичественного определения ГМО по белку CP4 EPSPS в образцах, содержащих ГМ-кукурузу с концентрацией 0,1%.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. ENGL ad hoc group Overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorized genetically modified materials // JRC Scientific and Technical Report. – 2011.
2. Pöpping B. Methods for the detection of genetically modified organisms: Precision, pitfalls and proficiency // International Laboratory. – 2001. – Vol. 31(4). – P. 23-29.
3. Detection of genetically modified organisms in foods by protein- and DNA-based techniques: bridging the methods / G.J. Van Duijn, R. Van Biert, H. Blecker-Marcelis [et al.] // J. AOAC Int. – 2002. – Vol. 85(3). – P. 787-791.
4. Генетика / В.Л. Петухов, О.С. Короткевич, С.Ж. Стамбеков [и др.]. – Новосибирск, 2007. – 628 с.

5. *International Organization for Standardization (ISO) Foodstuffs Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products protein based methods. EN ISO 21572:2004.*
 6. *International Organization for Standardization (ISO) Foodstuffs Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products general requirements and definitions. EN ISO 24276:2006.*
 7. Meyer R., Jaccaud E. Detection of genetically modified soya in processed food products: Proceedings of the EURO FOOD CHEM IX Conference. – Interlaken. Switzerland. Event, 1997. – N 220. 1. – P. 23-28.
 8. Production of certified reference materials for the detection of GMO / S. Trapmann, H. Schimmel, G.N. Kramer [et al.] // *Journal of AOAC International*. – 2002. – Vol. 85 (3). – P. 775-779.
 9. Mulis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalized chain reaction // *Methods in Enzymology*. – 1987. – Vol. 155. – P. 335.
 10. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: Testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results / C. Wolf, M. Scherzinger, A. Wurz [et al.] // *Eur. Food Res. Tech.* – 2000. – Vol. 210. – P. 36.
 11. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR based methods / A. Wurz, A. Bluth, P. Zelz [et al.] // *Food Control*. – 1999. – Vol. 10. – P. 385-389.
 12. Huang H.Y., Pan T.M. Detection of genetically modified maize MON810 and NK603 by multiplex and Real-time polymerase chain reaction methods // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – Vol. 52(11). – P. 3264-3268.
 13. Hübner P., Stude E., Lüthy J. Detection of genetically modified organisms in food // *Nature Biotech.* – 1999. – Vol. 17. – P. 1137-1138.
 14. Jensen A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): past, present and future perspectives // *Biotechnology Advances*. – 2009. – Vol. 27. – P. 1071.
 15. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain / M. Miraglia, K.G. Berdal, C. Brera [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2004. – Vol. 42. – P. 1157-1180.
 16. Stave J.W. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: Applications, limitations, and practical considerations // *J. AOAC Int.* – 2002. – Vol. 85(3). – P. 780-786.
 17. Stave J.W. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – future needs // *Food Control*. – 1999. – Vol. 10, Issue 6. – P. 367-374.
 18. Characterisation of the roundup ready soybean insert / P. Windels, I. Taverniers, A. Depicker [et al.] // *Eur. Food Res. Tech.* – 2001. – Vol. (213). – P. 107-112.
 19. Development of a line specific GMO detection method: A case study / P. Windels, I. Theuns, J. Dendaauw [et al.] // *Fac. Landbouwk. Toegepaste Biol. Wet.* – 1999. – Vol. 64(5b). – P. 459-462.
 20. GMDD: A database of GMO detection methods / D. Wei, Y. Litao, S. Kailin [et al.] // *BMC Bioinformatics*. – 2008. – Vol. 9. – P. 260.
 21. Moens A., Sneyers M. Detection of genetically modified plant products by protein strip testing: an evaluation of real life samples // *Eur. Food Res. Technol.* – 2007. – Vol. 225. – P. 49.
-
1. ENGL ad hoc group Overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorized genetically modified materials. *JRC Scientific and Technical Report*. 2011.
 2. Pöpping B. Methods for the detection of genetically modified organisms: Precision, pitfalls and proficiency. *International Laboratory*, Vol. 31(4) (2001): 23-29.
 3. Van Duijn G.J., Van Biert R., Bleeker-Marcelis H. et al. Detection of genetically modified organisms in foods by protein- and DNA-based techniques: bridging the methods. *J. AOAC Int.*, Vol. 85(3) (2002): 787-791.
 4. Petukhov V.L., Korotkevich O.S., Stambekov S.Zh. i dr. *Genetika* [Genetics]. Novosibirsk, 2007. 628 p.
 5. International Organization for Standardization (ISO) Foodstuffs Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products protein based methods. *EN ISO 21572:2004*.
 6. International Organization for Standardization (ISO) Foodstuffs Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products general requirements and definitions. *EN ISO 24276:2006*.

7. Meyer R., Jaccaud E. Detection of genetically modified soya in processed food products: *Proceedings of the EURO FOOD CHEM IX Conference*. Interlaken. Switzerland. Event, no. 220. 1 (1997): 23-28.
8. Trapmann S., Schimmel H., Kramer G.N. et al. Production of certified reference materials for the detection of GMO. *Journal of AOAC International*, Vol. 85 (3) (2002): 775-779.
9. Mulis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalized chain reaction. *Methods in Enzymology*, Vol. 155 (1987): 335.
10. Wolf C., Scherzinger M., Wurz A. et al. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: Testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *Eur. Food Res. Tech.*, Vol. 210 (2000): 36.
11. Wurz A., Bluth A., Zelz P. et al. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR based methods. *Food Control*, Vol. 10 (1999): 385-389.
12. Huang H.Y., Pan T.M. Detection of genetically modified maize MON810 and NK603 by multiplex and Real-time polymerase chain reaction methods. *J Agric. Food Chem.*, Vol. 52(11) (2004): 3264-3268.
13. Hübner P., Stude, E., Lüthy J. Detection of genetically modified organisms in food. *Nature Biotech.*, Vol. 17 (1999): 1137-1138.
14. Jensen A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): past, present and future perspectives. *Biotechnology Advances*, Vol. 27 (2009): 1071.
15. Miraglia M., Berdal K.G., Brera C. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. (42) (2004): 1157-1180.
16. Stave J.W. Protein immunoassay methods or detection of biotech crops: Applications, limitations, and practical considerations. *J. AOAC Int.*, Vol. 85(3) (2002): 780-786.
17. Stave J.W. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – future needs. *Food Control.*, Vol. 10, Issue 6 (1999): 367-374.
18. Windels P., Taverniers I., Depicker A. et al. Characterisation of the roundup ready soybean insert. *Eur. Food Res. Tech.*, Vol. (213) (2001): 107-112.
19. Windels P., Theuns I., Dendauw J. et al. Development of a line specific GMO detection method: A case study. *Fac. Landbouwk. Toegepaste Biol. Wet.*, Vol. 64(5b) (1999): 459-462.
20. Wei D., Litao Y., Kailin S. et al. GMDD: A database of GMO detection methods. *BMC Bioinformatics*, Vol. 9 (2008): 260.
21. Moens A., Sneyers M. Detection of genetically modified plant products by protein strip testing: an evaluation of real life samples. *Eur. Food Res. Technol.*, Vol. 225 (2007): 49.

APPROACHES TO INVESTIGATION OF GENE MODIFIED MAIZE AND SEMI-QUANTITATIVE ANALYSIS BY MEANS OF CP4 EPSPS PROTEIN

Popovski Z., Miskoska-Milevska E., Nestrovski T., Kamaldinov E. V., Petukhov V. L.

Key words: gene-modified organisms, maize, protein, test strip, immunofluorescence assay

Abstract. The article explores application of different methods aimed at finding gene-modified organisms (GMO) on concentration of protein in the samples of food products. As starting material, the researchers used seeds of gene-modified maize NK603 with different concentration of GMO represented by International Seed Testing Association (ISTA) in frames of the programme of quality assessment. The researchers used specific test strips for qualitative and immunofluorescence assay (IFA) for semi-quantitative analysis where they used CP4 EPSPS molecules of protein. The research has shown that application of test stripes contributes to searching for 0.6% of GMO. Sensation threshold of test stripes is found in temperature processing at 80 °C. The linear regressive correlation confirms ability to apply the suggested approach and immunofluorescence assay for semi-quantitative determination of GMO on protein CP4 EPSPS in the samples that contain GM-corn with concentration 0.1 %. The paper notes slight differences in application of filters with different waves.