

СУЧАСНІ МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛІЗУ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН

А. С. Секан
Б. В. Сорочинський

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України», Київ

E-mail: ehirta3@gmail.com

Проаналізовано сучасні методи скринінгу та кількісного аналізу генетично модифікованих рослин, серед яких найпоширенішими є методи полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), кількісної ПЛР реального часу та множинної ПЛР. Описано новітні аналітичні підходи до ідентифікування, детектування та кількісного визначення трансгенної ДНК в харчових продуктах та рослинній сировині. Особливу увагу приділено методам, що дають змогу здійснювати визначення багатьох трансгенних ознак одночасно (технологія біосенсорів і метод мікроматриць).

Ключові слова: ГМО, ПЛР, ПЛР реального часу, ДНК-біосенсори, мікроарей-аналіз.

Ідентифікація генетичних модифікацій у сортах рослин та отриманих з них харчових продуктів під час державної реєстрації, визначення кількісного вмісту ГМ-компонентів у харчових продуктах і кормах для тварин з метою їх подальшого маркування та потреба у здійсненні постреєстраційного моніторингу трансгенних організмів у тих країнах, де це передбачено відповідним національним законодавством, потребують розроблення надійних методів якісного та кількісного аналізу різноманітної ГМ-продукції. Методи детектування ГМ-організмів (ГМО) повинні відповідати таким критеріям [1]:

1. Дозволяти здійснювати аналіз різних видів ГМО та давати можливість отримати інформацію про кількісний вміст ГМ-матеріалу в досліджуваному об'єкті.

2. Бути придатними для аналізу широкого переліку продуктів харчування та сільськогосподарської сировини, що можуть істотно відрізнятися за складом компонентів, наявністю домішок і перебувають у різному агрегатному стані.

3. Мати високу чутливість, а отримані результати — бути легко інтерпретованими, надійними, достовірними і відтворюваними у будь-якій іншій науковій лабораторії.

Ідентифікацію ГМО можна здійснювати, застосовуючи різні підходи, а саме: аналіз нових фенотипових ознак, що характерні для генно-інженерного організму; визначен-

ня специфічних РНК, що експресуються на привнесених генах; вивчення синтезованих у трансгенних організмах нових протеїнів та метаболітів або безпосереднє визначення привнесених фрагментів ДНК, що входили до генетичної конструкції, використаної для трансформації. Найпоширенішими сьогодні методами аналізу ГМО є імунохімічні, які дозволяють детектувати нові синтезовані протеїни в досліджуваному зразку (імуносорбентний аналіз, ELISA та його різновиди, аналіз за допомогою індикаторних смужок — імунострипів), а також методи, що дають змогу встановити наявність привнесених фрагментів ДНК в геномі організму-реципієнта. Методи, що спрямовані на аналізування ДНК, дозволяють заздалегідь здійснити скринінг з метою отримати попередню інформацію про наявність генетичних модифікацій в досліджуваному об'єкті за принципом «ТАК» або «НІ», визначити цільовий привнесений ген; ідентифікувати використану для трансформації генетичну конструкцію та встановити конкретну подію генетичної трансформації (event-specific methods) [2].

На сьогодні найчастіше застосовуваним методом аналізу ДНК, виділеної з ГМО, є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), в основу якої покладено природну здатність ДНК до дуплікації. ПЛР використовують для здійснення попереднього скринінгу невідомих зразків на присутність в них ГМО (ви-

значаючи наявність промотору 35S та/або термінатора pos, які є найбільш уживаними регуляторними послідовностями для більшості сучасних комерціалізованих ГМ-рослин) і для визначення кількісного вмісту ГМ-компонентів у рослинній та продовольчій сировині [3, 4].

Відповідно до практики, що прийнята в Європейському Союзі, методи детектування, ідентифікації та аналізу кількісного вмісту ГМО спочатку мають бути апробовані в циклах міжлабораторних порівнянь, до яких залучають велику кількість лабораторій, а вже потім — валідовані (схвалені до використання). На сьогодні в країнах ЄС валідованими є методи для здійснення якісного скринінгу харчових продуктів на наявність в них ГМ-сої, ГМ-кукурудзи та їх сумішей; скринінговий метод на основі ПЛР реального часу для визначення вмісту ГМ-сої, методи ПЛР реального часу для визначення кількісного вмісту ГМ-сої та ГМ-кукурудзи, імуноензимні методи для детектування ГМ-сої та ГМ-кукурудзи і розрахунку їх кількісного вмісту [5].

Подібну практику апробації нових методів шляхом проведення міжлабораторних порівнянь прийнято також і в країнах, що підписали Північноамериканський договір про вільну торгівлю (NAFTA), та в країнах Південної Америки і Південно-Східного Азійського регіону, що мають надзвичайно великий досвід аналізу різних видів ГМО [6].

Такий самий підхід (проведення міжлабораторних порівнянь та здійснення метрологічної характеристики методу) застосовує і Міжнародна організація зі стандартизації (ISO), яка затвердила низку міжнародних стандартів для аналізу ГМО. Чинний Міжнародний стандарт ISO 21569:2005 містить докладний опис процедур аналізу, що дозволяють аналітичним лабораторіям надавати висновки про наявність або відсутність ГМО найбільш поширених ліній, серед яких соя лінії GTS 40-3-2, кукурудза ліній Bt-176, Bt-11, T25, MON810, а також ГМ-томати лінії Zeneca® 282F [7]. Окрім цього, у стандарті описано процедуру скринінгу на основі виявлення регуляторних послідовностей, промотору 35S і термінатора pos, а також гена, що кодує неоміцинофосфотрансферазу, — nptII. В іншому стандарті ISO 21570:2005 наведено повні описи процедур кількісної оцінки шести найпоширеніших ГМ-ліній: сої GTS 40-3-2 та кукурудзи — Bt-176, Bt-11, GA21, T25, MON810 [8]. Усі описані в цьому документі методи пройшли метрологічну атестацію згідно з вимогами ISO 5725-2.

Однак у згаданих документах подано протоколи для аналізу лише незначної частини з великої кількості зареєстрованих на цей час ГМ-організмів (www.agbios.com), тому подальше вдосконалення існуючих методів та розроблення нових, більш простих і водночас чутливих, є вкрай актуальним завданням. Основні зусилля спрямовані насамперед на можливість аналізувати одночасно декілька різних генно-інженерних подій, при цьому велику увагу приділено також підвищенню чутливості методів у термінах «меж чутливості» (LOD) та «кількісного визначення» (LOQ) [9].

Нові підходи до проведення скринінгу ГМО

Як правило, скринінг ГМО здійснюють, вивчаючи наявність у досліджуваних зразках нуклеотидних послідовностей, що відповідають промотору 35S, та/або термінатора pos. Отримані в ПЛР амплікони в подальшому аналізують за допомогою гель-електрофорезу в агарозному гелі. Звичайний гель-електрофорез не є автоматизованим, має не дуже високу чутливість і в разі аналізування декількох різних зразків потребує досить багато часу. Тому розроблення мультиплексних аналітичних систем та заміна звичайного агарозного гель-електрофорезу на більш чутливий капілярний електрофорез (КЕ) є актуальним завданням і на його вирішення спрямовуються зусилля різних наукових колективів. Приклад ефективного використання множинної ПЛР для вивчення декількох ГМО у подальшій комбінації з КЕ наведено в публікації Hernandez et al. [10], в якій описано одночасне детектування чотирьох різних ліній ГМ-кукурудзи (Bt11, MON810, T25, GA21). Продукти ампліфікації спочатку аналізували в агарозному гель-електрофорезі, де було встановлено межу визначення як 0,05%. Порівняння ефективності традиційного гель-електрофорезу з капілярним показує перевагу останнього — він дозволяє здійснювати аналіз великої кількості зразків одночасно та з більшою точністю [11]. Застосування КЕ з лазеріндукованою флуоресценцією описано в роботі [12]. Такий підхід дозволив детектувати одночасно 5 ліній трансгенної кукурудзи (Bt11, T25, Mon810, GA21, Bt176). Автори використали флуоресцентний інтеркалюючий барвник YOPRO-1 та гідроксиметилцелюлозу як фільтраційне середовище. Час розділення ампліконів у гелі становив 30 хв, чутливість детектування було встановлено

на рівні 0,05%. Ще один приклад використання КЕ для детектування ГМО наведено в публікації [13], у якій ідеться про модифікацію цього методу мінімізацією розмірів відповідного обладнання. Було розроблено спеціальний пристрій з двох скляних поверхонь (розмір кожної становив 25×76 мм), термічно відпалених одна на одній, у результаті чого утворилася замкнена структура. Фотомаски конструювали, застосовуючи замість хромованих підкладок полімерний матеріал, канали для електрофорезу мали діаметр 30 мм, довжина каналів — 4,5 см. До роздільного буфера разом з флуоресцентним інтеркалюючим барвником SYBR Green I було додано гідроксипропілметилцелюлозу. Для детектування розділених продуктів ампліфікації — промотору 35S (195 п.н.) та термінатора pos (180 п.н.) використовували лазеріндуковану флуоресцентну систему. Час розділення та детектування становив менш ніж 60 с, межа чутливості — 0,1%.

Ще один приклад застосування КЕ для одночасного аналізу кукурудзи ліній Vt11, Ga21, MON810 та NK603 наведено в публікації [14]. Автори використовували праймери, що фланкували послідовності між рослинним геномом і трансгеном. Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою КЕ, який дозволяв проводити ідентифікацію ампліконів за розміром та кольором. Усі мішені були мічені попередньо, під час ПЛР, такими флуоресцентними барвниками, як 6-карбоксіфлуоресцеїн, тетра-6-карбоксіфлуоресцеїн та гексахлоро-6-карбоксіфлуоресцеїн. Амплікони приблизно однакових розмірів позначали різними барвниками. Після проведення реакції було визначено ліміт детекції в 0,1% для кожного ГМО.

Для ПЛР-аналізу ГМО використовують також «пептидні нуклеїнові кислоти» (ПНК, PNA — peptide nucleic acids) [15]. ПНК — це синтетичні гомологи нуклеїнової кислоти, які містять стандартні нуклеотиди ДНК, але поліамідний ланцюг у цьому разі замінено на N-(2-аміноетил)-гліцинові одиниці, а пари нуклеотидів з'єднуються між собою метиленкарбонільними зв'язками. Нейтральний ланцюг в такому вигляді не має здатності до відштовхування під час гібридизації. Таким чином пояснюється той факт, що ПНК може зв'язатися з ДНК чи РНК з високим ступенем специфічності. Для детектування ГМО специфічні ПНК-фрагменти було сконструйовано таким чином, щоб інгібувати ПЛР шляхом конкурування з праймерами на стадії їх «відпалювання» до специфічної послідовності, гібридизувати

суміжні та наступні за конкуруванням праймери чи гібридизувати їх будь-де вздовж ампліфікованої послідовності.

Для економії часу і здійснення одночасного аналізу більшої кількості зразків розробили метод гібридизації на єдиній підкладці з наступним проведенням мікротитрування (microtiter well-based hybridization assays). Застосування цього високочутливого білюмінометричного гібридизаційного методу для скринінгу ГМО описали Glunoy et al. [16]. Як досліджуваний зразок використовували ГМ-сою Roundup Ready. Біотинільовані ПЛР-продукти (промотор 35S, термінатор pos та ген лектину) захоплювали на поверхні мікродунок, закритих стрептавідинном, та гібридизували з олігонуклеотидним зондом, що містив специфічну послідовність і на кінці — полі(дТ). Проявлення гібридів здійснювали, додаючи репортерний універсальний агент, який складався з Ca²⁺-залежного фотопротейну екворину, кон'югованого з олігонуклеотидом (дА)₃₀. Зв'язування екворину з гібридом та додавання при цьому розчину Ca²⁺ спричинило короточасну емісію енергії. Автори продемонстрували високу чутливість методу, де межа детектування для ГМО становила 0,05%.

Застосування біосенсорів для аналізу ГМО

Іншою альтернативою для вирішення проблеми одночасного детектування різних ГМО-зразків є використання біосенсорів, що зробило тестування ГМО простішим, швидшим та здешевило проведення аналізу. Попит на методи ДНК-аналізу для скринінгу ГМО постійно підтримується розробленням нових сенсорних технологій, які забезпечують більш точне отримання результатів і потребують залучення меншої кількості обладнання порівняно з ПЛР. На прикладі простих сенсорів можна спостерігати за швидкими змінами параметрів, зокрема таких, як рН, температура, в'язкість, вміст цукру тощо. Принцип роботи біочипів полягає в специфічній зміні фізичних властивостей (наприклад, електричної провідності чи рефрактивного індексу). Під час перебігу реакції такі зміни можуть бути перетворені на електричний сигнал. Біосенсори є специфічними системами, які несуть на собі елементи, що забезпечують перетворення та передачу сигналу. Біоелементи при цьому можуть бути як комплексною структурою, наприклад частиною тканини чи органели, так і складатися з ізольованих молекул (ан-

титіла, ензими, нуклеїнова кислота) [17]. Біочипи можуть мати високу специфічність під час часткового аналізу, що відповідає величині сигналу, прямо пропорційній до вмісту досліджуваного зразка. Технології біосенсорів базуються на використанні оптичних, електрохімічних або п'єзоелектричних трансдукторів, що дозволяють реєструвати ампліфіковані послідовності. Поєднання технологій біосенсорів або мікроареїв та ПЛР є ефективним для детектування ГМО, створюючи умови для високоефективного та швидкісного аналізу зразків. Навіть якщо біочипи згодом не замінять кількісну ПЛР для детермінування, використання таких технологій буде доцільним на попередньому етапі контролю у процесі ідентифікування ГМО.

Застосування електрохімічних сенсорів для детектування гена *CryI A(b)* кукурудзи лінії MON 810 було описано у [18]. Цільову послідовність спочатку ампліфікували з використанням одного тіольованого та одного біотинільованого праймерів. Після завершення перебігу реакції незадіяні праймери обробляли нуклеазою S1, амплікони очищували, додаючи магнетний феросцен-стрептавідин та зв'язували на поверхні золотих електродів через тіольну частину ампліконів. Агрегація ДНК на поверхню електродів пришвидшувалась у присутності барвника Hoechst 33258 (бісбензимід), що, у свою чергу, спричинило виникнення електрохімічного сигналу, детектованого за допомогою лінійної вольтамперометрії. Оцінювання кількості копій мішені в зразку проводили за розміром сигналу. Такий підхід дозволив детектувати ГМО у межах 0,9%. Іншим прикладом є опис роботи ензимних електрохімічних сенсорів, які було розроблено з метою використання олігонуклеотидмодифікованих відбиткових золотих електродів [19, 20]. Попередньо денатуровані продукти ПЛР взаємодіяли в розчині з біотинільованими зондами. Після цього такі кон'югати наносили на золоту поверхню електрода та гібридували до ще одного зонда, іммобілізованого через групу $-SH$. Після відмивання сенсорів до них додавали стрептавідиналкалінову фосфатазу, яка каталізує гідроліз нафтилфосфатного субстрату до електроактивної форми. Детектування здійснювали за допомогою диференційної пульс-вольтаметрії. Як альтернативу стрептавідиналкаліновій фосфатазі використали ще й субстратну суміш BCIP/NBT, додавання якої сприяє формуванню преципітату, що діє як діелектрик між поверхнею із золота та розчином

$[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ —відновлювальної групи. Для отримання результатів використовували імпедансну спектрометрію. Застосовуючи такі біосенсори для детектування зразків ГМ-сої та кукурудзи, реєстрували результати 1% та 5% ГМО відповідно [21]. Ще одне використання електрохімічних біосенсорів для скринінгу ГМО описано Керман *et al.* [22]. На склокарбонуву поверхню електроду до іммобілізованих ПНК гібридували цільові послідовності ДНК, що викликало електростатичні взаємодії між позитивно зарядженими $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ комплексами іонів та негативно зарядженими фосфатними ланцюгами ДНК. Накопичення позитивно заряджених іонів на поверхні сенсора спричиняє зростання електричної напруги.

Інший принцип дії покладено в основу біосенсорів поверхневого плазмонного резонансу (ППР, Surface Plasmon Resonance) [17]. Такі сенсори є оптичними, принцип дії їх ґрунтується на розпізнаванні мішені за зміною рефрактивного індексу між металевою та водневою частинами внаслідок гібридизації іммобілізованого на поверхні олігонуклеотиду та цільової послідовності. Зміна величини рефрактивного індексу прямопропорційна до зміни маси гібридизованих молекул. Перевагою використання таких систем є високий ступінь чутливості, точність та низький ліміт детектування. Для іммобілізації синтезованого олігонуклеотиду на поверхні біочипа, вкритого золотом, використовують два підходи. Перший з них полягає в захопленні біотинільованих проб на стрептавідиновій поверхні із золота, попередньо обробленій меркаптоундеканолам, епіхлоргідрином та карбоксильованим декстраном. Перед нанесенням стрептавідину на декстранову поверхню її активізують *N*-гідроксисукцинімідом та карбодіімідом. Інший підхід полягає в безпосередньому закріпленні тіольованої проби на поверхні сенсора. Останній метод є більш популярним, оскільки є швидшим і дає простіші результати для подальшого аналізу. Залучення таких сенсорів для детектування ГМО дозволяє отримати результати впродовж 1 хв. У подібних дослідках для скринінгу трансгенних рослин автори [23] сконструювали біосенсор у форматі «одноразовий стрип, укритий сухим реагентом» (*dry-reagent disposable dipstick*), де золоті наночастинки з прикріпленими олігонуклеотидами становили інтегральну частину сенсорів. Протягом 7 хв біотинільовані ПЛР-амплікони гібридували в розчині з пробами, які мали у своєму складі оліго(дА)-хвіст та 3'-кінець.

У разі гібридизації цільової ДНК з іммобілізованим зондом на сенсорній поверхні відбувалася зміна. У досліджуваних зразках сої було визначено 0,1% ГМ-компонента. Інший приклад оптичних біосенсорів, які використовували для скринінгу ГМО, — силікатні біочипи, що складаються з поверхні, вкритої нітридом кремнію (Si_3N_4) як оптичним елементом [24]. Сенсорну поверхню модифікували гідрозином для зв'язування олігонуклеотидних проб з альдегідною групою на 5'-кінці. Результатом реакції була також зміна кольору на поверхні біосенсора від золотистого до блакитного.

П'єзоелектричні сенсори дозволяють реєструвати зміну (збільшення) маси сенсора впродовж гібридизації [25], що пояснюється зміною резонансної частоти. Сенсори кварцево-кристалічного мікробалансу (ККМ, Quartz Crystal microbalance) складаються із кварцевої поверхні, до якої прикріплено золоті електроди (поверхня із золота сприяє швидкій іммобілізації проб). ККМ-сенсори дають змогу проводити моніторинг гібридизації у форматі реального часу без потреби мічення послідовності ДНК чи самих проб. Для іммобілізації проб на кварцево-кристалічній поверхні із золота спробували застосувати дві стратегії: пряму іммобілізацію тіольованої проби чи її захоплення від стрептавідинової поверхні сенсора. Більш ефективним для оптимізації процесу виявився перший підхід, хоча динамічний діапазон в останньому був ширший. Сенсори такого типу застосовували для детектування гена *Cry1A(b)*, привнесеного від *Bacillus thuringiensis*. Зміна резонансної частоти лінійно залежала від відсоткового складу ГМО в діапазоні 0,1 — 5% ГМ-кукурудзи лінії MON 810 [26].

Застосування методу мікроматриць (мікроареїв) для вивчення трансгенних організмів

Для вивчення ГМО використовують також і метод мікроматриць (мікроареїв). Впровадження технології мікроматриць дозволило вирішити багато питань сучасної біології та медицини. Технології мікроареїв застосовують для аналізу диференційної експресії генів [27], детектування SNP (single nucleotide polymorphisms) [28], генотипування [29], філогенетичного аналізу, ідентифікації маркерів пухлин та для розроблення фармацевтичних препаратів. Мікроарей-аналіз був розроблений у 1995 р. [27]. Описано використання автоматичних систем для

закріплення ДНК-олігонуклеотидів разом з біочипами на скляній поверхні. Досліджувани мічені κДНК брали з різних зразків *Arabidopsis thaliana*. На чипах мРНК гібридизувалася з ДНК. У перших експериментах брали лише послідовність із 45 олігонуклеотидів. Невдовзі ця робота поклала початок багатьом іншим експериментам з дослідження генома бактерій, грибів, кукурудзи, а також людини. Технологію мікроареїв для аналізу ГМО було впроваджено паралельно з використанням множинної ПЛР. Мікроареї дозволяють ефективно комбінувати детектування, ідентифікацію та кількісний аналіз великої кількості досліджуваних ГМ-зразків під час однієї реакції. Формат мікроарей-технології дозволяє адаптувати метод і для детектування специфічних протеїнів у межах короткого періоду.

Мікроарей — це скляна або полімерна поверхня, на яку наносять різні фрагменти ДНК. Завдяки наявності комплементарних послідовностей ДНК досліджуваного зразка та ДНК, іммобілізованих на поверхні мікроареїв, відбувається їх гібридизація. Цим мікроарей-технології дещо подібні до Northern-гібридизації, вже традиційного методу для кількісного визначення рівня генної експресії [28]. У цьому методі використовують зразки ДНК або РНК, що містяться на нейлоновому фільтрі. Northern-аналіз дозволяє виявити кількісну різницю в експресії генів між зразками, але лише у разі окремих, наперед визначених генів. Мікроматриці містять окремі проби κДНК або синтезованих олігонуклеотидів, які нанесено на поверхню у вигляді мікроскопічних плям (у біоінформатиці їх називають ознаками) [30]. Таких плям на одній мікроматриці може міститись до 30 000 і більше. У процесі гібридизації відбувається зміна кольору флуоресцентної мітки, яка зв'язана з ДНК, нанесеною на мікроарей, що свідчить про наявність у досліджуваному зразку ДНК-мішені. Гібридизація, яка відбувається на одній матриці, є альтернативою для великої кількості Northern-аналізів [31]. Отримані результати аналізують за допомогою комп'ютерного обладнання для детектування інтенсивності флуоресценції кожної плями. Оскільки рівень інтенсивності залежить від комплементарності молекули ДНК та кількості зразків, одержані кількісні показники інтенсивності використовують для визначення вмісту зразків у досліджуваному матеріалі. У більшості випадків кожен чип на мікроарей-поверхні містить ДНК окремого гена, тому інтенсивність флуоресценції

можна інтерпретувати як рівень генної експресії [28].

Технологія мікроареїв може поєднуватися із множинною ПЛР, наприклад для оцінювання відсоткового вмісту ГМ-частки в рослині, у зразках їжі та харчових домішках, при цьому використовують ПЛР-амплікони як комплементарні послідовності для гібридизації з пробами на ДНК-матриці. Матриці зі зменшеною кількістю іммобілізованих проб на своїй поверхні — «low density array» дозволили проводити паралельне детектування восьми ГМ-подій, включаючи 35 S-промотор, pos-термінатор та ген *nptII*, використовуючи при цьому біотинільовані амплікони [32]. У процесі конструювання такої структури застосовують мікропористий утвір — гідрофобний поліестр як твердий носій з іммобілізованими пробами, комплементарними до послідовностей специфічних генів для детектування сої Roundup Ready [33]. Така система не лише визначає факт наявності привнесеної конструкції, але й дає змогу розрізнити, до якого сорту ГМ-рослин належить досліджуваний зразок.

Компанія Eppendorf випускає вже схвалені в ЄС DualChip-мікроареї (EAT, Namur, Belgium) для детектування ГМО, що уможливує скринінг усіх комерціалізованих на сьогодні ГМ-рослин. За допомогою наборів DualChip (житів) можна одночасно проводити детектування ГМО-специфічних маркерів, сортів та здійснювати скринінг ГМО на різних рівнях споживчого ланцюга. Технологія базується на залученні специфічних ПЛР-ампліконів та гібридизації їх на поверхні матриці з відповідними олігонуклеотидами. У разі використання DualChipГМО-житів можна швидко та легко отримати результати стосовно наявності привнесених ГМ-послідовностей. У системі біочипів компанії Eppendorf для аналізу генної експресії, виявлення ГМО у їжі та аналізу мРНК також застосовують ДНК-мікроареї (<http://www.biochipsystems@eppendorf.de>).

Для скринінгу ГМО використовують і мікроматриці із залученням ПНК як іммобілізованих проб, оскільки якість гібридизації за їхньою участю є дещо вищою. ПНК-чипи було розроблено для паралельного аналізу чотирьох ГМ-ліній кукурудзи, одного трансгенного сорту сої, двох ендегенних контролів та продуктів харчування [34]. Закріплення ПНК-проб на носії було схожим за принципом дії до олігонуклеотидних. Отримання специфічних ампліконів здійснювали за допомогою мультиплексної ПЛР, де використовували один із праймерів, мічений

флуоресцентним барвником Су5. Після проведення циклів ампліфікації було визначено ліміт детектування для кожного аналізованого зразка, який становив 0,25%. Для мікроарей-аналізу з використанням ПНК визначили мінімальну концентрацію ампліконів, які можна було б детектувати, — 1 нМ. Таке удосконалення технології мікроареїв показало високу чутливість методу, що дозволяє проводити детектування та ідентифікацію ГМО впродовж усього споживчого ланцюга.

Rudi et al. [35] запропонували використовувати мікроарей-технологію для ідентифікації ГМО в продуктах харчування. Із цією метою було розроблено універсальну матрицю для детектування трансгенів, яка містила закріплені синтезовані олігонуклеотиди [36, 37] з подібними термодинамічними характеристиками, але дещо відмінними за своєю послідовністю. Таку технологію було запропоновано Gerry et al. у комбінації з багатоканальною універсальною матрицею [38]. При цьому кожен олігонуклеотид мітять флуоресцентною міткою на 5'-кінці, тоді як з 3'-кінця знаходяться послідовності, які мають назву ZipCode і є комплементарними до послідовностей, теж ZipCode, закріплених на матриці. Гібридизація олігонуклеотидів відбувається безперервно за участю термостабільної ДНК-лігази, яка з'єднує кінці обох фрагментів.

Особливу увагу приділяють детектуванню невідомих ГМО, оскільки зі зростанням попиту на модифіковані рослини збільшується й можливість потрапляння на ринок незареєстрованих трансгенів, що становить значний ризик для довкілля. Було розроблено методику для проведення скринінгу невідомих ГМО [39], де як модель досліду обрано *Arabidopsis thaliana* та *Oryza sativa*. Принцип методики полягав у безпосередній гібридизації тотальної геномної ДНК з референтними послідовностями, зв'язаними на поверхні високонасиченого мікроарею. Такі проби містили послідовності завдовжки 25 п.н., виділених від 235 векторів. Результатом стало детектування трансгенних послідовностей у трансформованих *A.thaliana* та *O.sativa* без попередніх даних про трансформуючі вектори Т-ДНК конструкцій, використаних у досліджуваних рослинах. Цей підхід дасть змогу детектувати наявність трансгенної послідовності та надати дослідникові достатню інформацію про невідому генетичну конструкцію. Ще одним прикладом детектування невідомих сортів ГМО за допомогою мікроарей-аналізу може слугувати

опис досліджу з *A. thaliana* екотипу Colambia (Co-0) (NCBI GeneBank a.n. NC003070.3, NC003071.2, NC003074.3, NC003075.1, NC003076.1) [37]. У цьому разі синтезували найбільш вірогідну олігонуклеотидну послідовність, яка б підходила для привнесеної генетичної конструкції *A. thaliana*.

Окрім скринінгу трансгенів велику увагу приділяють й ідентифікації так званих «непередбачених ефектів» (синтез нехарактерних для модифікованого організму сполук) у ГМ-продуктах. Найефективніший спосіб ідентифікації полягає в аналізі фланкуючих регіонів на межі ГМ-конструкція — геном рослини. У випадку подібних досліджень інформація стосовно складу геному не ГМ-організмів та регуляції генної експресії й досі лишається обмеженою, тому актуальним є секвенування та аналіз місця вбудовування ГМ-конструкції — важливий момент у визначенні майбутніх можливих фенотипових змін у трансгенній рослині. Ймовірні зміни у фенотипі рослин можуть бути ідентифіковані шляхом порівняння аналізу росту, врожайності, стійкості до хвороб, хімічного складу тощо інтактних та ГМ-рослин. Аналіз хімічного складу є важливою частиною проведення досліджень з безпечності харчових ГМ-продуктів. Kuiper et al. [40] вдалося сконструювати мікроматриці, за допомогою яких проводили аналіз та порів-

няння зміни генної експресії в ГМ-рослинах. Автори розробили «інформаційну» мікроматрицю (моделями слугували геноми томатів та картоплі), в основу якої було покладено зразки декількох комерціалізованих мікроареїв, що застосовуються для скринінгу ГМО. Було продемонстровано високу чутливість та специфічність такої конструкції, що дозволяє застосовувати її в аналізі ГМ-організмів.

Таким чином, основними критеріями для використання того чи іншого методу аналізу ГМО є насамперед його чутливість, тривалентність реакції, доступність та простота виконання, вартість реагентів і обладнання, а також можливість здійснювати одночасне детектування якомога більшої кількості зразків. На сьогодні найширше застосовуваними методами аналізу ГМО є різні варіанти полімеразної ланцюгової реакції. Водночас, поряд із ПЛР вже зараз почали інтенсивно використовувати ДНК-біосенсори, що дозволяє здійснювати більш якісний скринінг трансгенів. Такий підхід до аналізу ГМО вже отримав схвалення в ЄС. Наступний крок у впровадженні нових аналітичних методів — використання мікроарей-технологій, основною перевагою яких є можливість детектування необмеженої кількості різних досліджуваних зразків трансгенів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сорочинський Б. В., Данильченко О. О., Крїпка Г. В. Біотехнологічні (генетично модифіковані) рослини. Видання друге, доповнене. — К.: КВІЦ, 2006. — 220 с.
2. Holst-Jensen A., Ronning S. B., Lovseth A., Bedal K. G. // Anal. Bioanal. Chem. — 2003. — V. 375. — P. 985–993.
3. Генетически модифицированные источники пищи: оценка безопасности и контроль / Под ред. В. А. Тутельяна. — М.: Изд-во РАМН, 2007. — С. 71 — 72.
4. Miraglia M., Berdal K. G., Brera C. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain // Food Chem. Toxicol. — 2004. — V. 42. — P. 1157–1180.
5. European Commission. GMO analyses within the EU: a short update. <http://biotech.jrc.it/methodsdatabase.htm>.
6. ILSI International Food Biotechnology Committee, 2007. Sampling and Detection Methods for Products of Modern Agricultural Biotechnology in NAFTA Countries. International Life Sciences Institute Washington, DC. <http://www.ilsi.org/>.
7. ISO 21569:2005. Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods.
8. Ibid. — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods.
9. European Commission, 2001. Review of GMO detection and quantification techniques. <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/home/documents/EUR20384Review.pdf>.
10. Hernandez M., Rodriguez-Lazaro D., Zhang D. et al. Interlaboratory Transfer of a PCR Multiplex Method for Simultaneous Detection of Four Genetically Modified Maize Lines: Bt11, MON810, T25, and GA21 // J. Agric. Food. Chem. — 2005. — V. 53. — P. 3333–3337.
11. Elenis D. S., Kalogianni D. P., Glunou K., Christopoulos T. K. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms // Anal. Bioanal. Chem. — 2008. — V. 392. — P. 347–354.
12. Garcia-Canas V., Gonzalez R., Cifuentes A. Sensitive and simultaneous analysis of five

- transgenic maizes using multiplex PCR, capillary gel electrophoresis and laser induced fluorescence // *Electrophoresis*. — 2004. — V. 25. — P. 2219–2226.
13. Kim Y. J., Chae J. S., Chang J. K., Kang S. H. Microchip Capillary Gel Electrophoresis Using Programmed Field Strength Gradients for the Ultra-Fast Analysis of GMO in Soybeans // *J. Chromatogr. A*. — V. 1083. — P. 179–184.
 14. Nadal A., Coll A., La Paz J. L. et al. A new PCR-CGE (size and color) method for simultaneous detection of genetically modified maize events // *Electrophoresis*. — 2006. — V. 27. — P. 3879–3888.
 15. Germini A., Mezzelani A., Lesignoli F. et al. Detection of Genetically Modified Soybean Using Peptide Nucleic Acids (PNAs) and Microarray Technology // *J. Agric. Food Chem.* — 2004. — V. 52. — P. 2535–4540.
 16. Glynou K., Ioannou P. C., Christopoulos T. K. Detection of transgenes in soybean via a polymerase chain reaction and a simple bioluminometric assay based on a universal aequorin-labeled oligonucleotide probe // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2004. — V. 378. — P. 1748–1753.
 17. Marmioli N., Maestri E., Gulli M. et al. Methods for detection of GMOs in food and feed // *Ibid.* — 2008. — V. 392. — P. 369–384.
 18. Chaumplik K., Kerman Y., Takamura E. T. Accumulation of amplified target DNA using thiol/biotin labeling, S1 nuclease, and ferrocene-streptavidin-magnetic system and a direct detection of specific DNA signals with screen-printed gold electrode // *Sci. Technol. Adv. Mater.* — 2007. — V. 8. — P. 323–330.
 19. Lucarelli F., Marrazza G., Mascini M. Enzyme-based impedimetric detection of PCR products using oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes // *Biosens. Bioelectron.* — 2005. — V. 20. — P. 2001–2009.
 20. Brewster J. L., Beason K. B., Eckdahl T. T., Evans I. M. The Microarray Revolution: Perspectives from Educators // *BAMBED*. — 2004. — V. 32, N 4. — P. 217–227.
 21. Carpini G., Lucarelli F., Marrazza G., Mascini M. Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids // *Biosens. Bioelectron.* — 2004. — V. 20. — P. 167–175.
 22. Kerman K., Vestergaard M., Nagatani N. Electrochemical genosensor based on peptide nucleic acid-mediated PCR and asymmetric PCR techniques: Electrostatic interactions with a metal cation // *Anal. Chem.* — 2006. — V. 78. — P. 2182–2189.
 23. Kalogianni D. P., Koraki T., Christopoulos T. K., Ioannou P. C. Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms // *Biosens. Bioelectron.* — 2006. — V. 21. — P. 1069–1076.
 24. Bai S. L., Zhong X., Ma L. et al. A simple and reliable assay for detecting specific nucleotide sequences in plants using optical thin-film biosensor chips. // *Plant.* — 2007. — V. 49. — P. 354–366.
 25. Tombelli S., Minunni M., Mascini M. Piezoelectric biosensors: strategies for coupling nucleic acid to piezoelectric devices // *Methods*. — 2005. — V. 37. — P. 48–56.
 26. Passamano M., Pighini M. QCM DNA-sensor for GMOs detection // *Sens. Actuators B*. — 2006. — V. 118. — P. 177–181.
 27. Zanders E. D. Gene expression analysis as an aid to the identification of drug targets // *Pharmacogenomics*. — 2000. — V. 1, N 4. — P. 375–384.
 28. Ivakhno S. S., Kornelyuk A. I. Abstract book of Conference for Young Scientists on Molecular Biology and Genetics / Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine. — 2003. — V. 76, N 2 — P. 73.
 29. Schena M. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes // *BioEssays*. — 1996. — V. 18. — P. 427–431.
 30. *The Mguide*. Version 2.0 (1999) The Brown Lab's complete guide to microarraying for the molecular biologist: <http://www.cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>
 31. Zammattéo N., Jeanmart L., Hamels S. et al. Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays // *Anal. Biochem.* — 2000. — V. 280, N 1. — P. 143–150.
 32. Leimanis S., Hernandez M., Fernandez S. et al. A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients // *Plant. Mol. Biol.* — 2006. — V. 61. — P. 123–139.
 33. Xu X., Li Y., Zhao H. et al. Rapid and reliable detection and identification of GM events using multiplex PCR coupled with oligonucleotide microarray // *J. Agric. Food Chem.* — 2005. — V. 53. — P. 3789–3794.
 34. Germini A., Rossi S., Zanetti A. et al. Development of a peptide nucleic acid array platform for the detection of genetically modified organisms in food // *Ibid.* — 2005. — V. 53. — P. 3958–3962.
 35. Rudi K., Rud I., Holck A. A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed // *Nucleic. Acids Rec.* — 2003. — V. 31. — P. 62.
 36. Hirschhorn J. N., Sclar P., Lindblad-Toh K. SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2000. — V. 97. — P. 12164–12169.

37. Nesvold H., Kristoffersen A. B., Holst-Jensen A., Berdal K. G. Design of a DNA chip for detection of unknown genetically modified organisms (GMOs) // *Bioinformatics*. — 2005. — V. 21, N 9. — P. 1917–1926.
38. Gerry P. N., Witowsky N. E., Day J. Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations // *J. Mol. Biol.* — 1999. — V. 292. — P. 251–262.
39. Tengs T., Kristoffersen A. B., Berdal K. G. et al. Microarray-based method for detection of unknown genetic modifications // *BMC Biotechnology*. — 2007. — V. 7. — P. 91.
40. Kuiper H. A., Kok E. J., Engel K.-H. Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment // *Cur. Opin. Biotech.* — 2003. — V. 14. — P. 238–243.
-

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ
МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
РАСТЕНИЙ**

*А. С. Секан
Б. В. Сорочинский*

ГУ «Институт пищевой биотехнологии
и геномики НАН Украины», Киев

E-mail: ehirta3@gmail.com

Проанализированы современные методы скрининга и количественного анализа генетически модифицированных растений, среди которых наиболее популярными являются методы полимеразной цепной реакции (ПЦР), количественной ПЦР реального времени и множественной ПЦР. Описаны новые аналитические подходы к идентифицированию, детектированию и количественному определению трансгенной ДНК в продуктах питания и растительном сырье. Особое внимание уделено методам, позволяющим осуществлять определение многих трансгенных признаков одновременно (технология биосенсоров и метод микроматриц).

Ключевые слова: ГМО, ПЦР, ПЦР реального времени, ДНК-биосенсоры, микроаррей-анализ.

**CURRENT METHODS
FOR MOLECULAR ANALYSIS
OF GENETICALLY MODIFIED
PLANTS**

*A. S. Sekan
B. V. Sorochinsky*

Institute of Food Biotechnology
and Genomics of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: ehirta3@gmail.com

Current methods of qualitative and quantitative analysis of genetically modified plants have been analyzed. PCR, quantification real time PCR and multiple PCR are the most popular among them. New analytical approaches for the identification, detection and quantification of transgenic DNA have described. Special attention is devoted to the biosensors and microarray methods that allow detecting simultaneously different transgenic features simultaneously.

Key words: GMO, PCR, real time PCR, DNA-biosensors, microarray analysis.