



Введение

- Понятие ГИО и их происхождение
- Биотехнологическая революция
- Необходимость методов идентификации ГИО
- Количественная идентификация трансгенов
 - Создание протоколов идентификации трансгенов
- Методы, основанные на анализе белков
- Методы, основанные на анализе ДНК
- ИК-спектроскопия
- Заключение

Коммерчески доступные генетически модифицированные растения

• Кукуруза	• Помидоры	• Люцерна
• Соя	• Свекла	• Табак
• Хлопок	• Папайя	• Рис
• Перец	• Картофель	• Сахарный тростник
• Цветная капуста	• Капуста	• Канола

Виды недоступных для коммерческого использования генетически модифицированных растений

Пшеница	Виноград	Ананас	Лук
Ячмень	Бананы	Морковь	Сельдерей

"Томакко" – Миф или реальность?

- Созданием растений под коммерческим названием "Томакко" семейство Симпсонов пытается доказать ограниченность науки (нач. 80-х)
- Ученый Роб Бауер из Освего, Орегон, доказывает, что создать такие растения возможно!!!

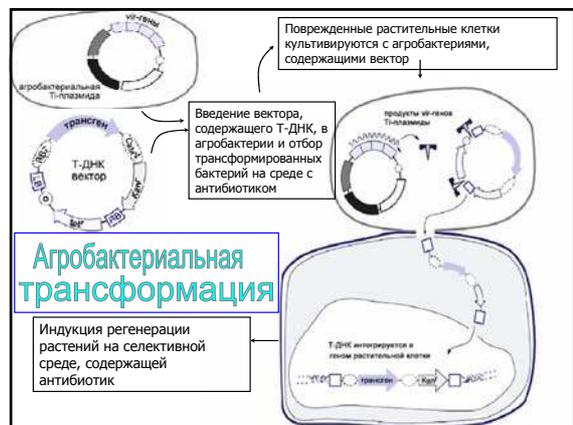
"Томакко" существует!!!

Методы трансформации растений

Генная пушка

Agrobacterium tumefaciens

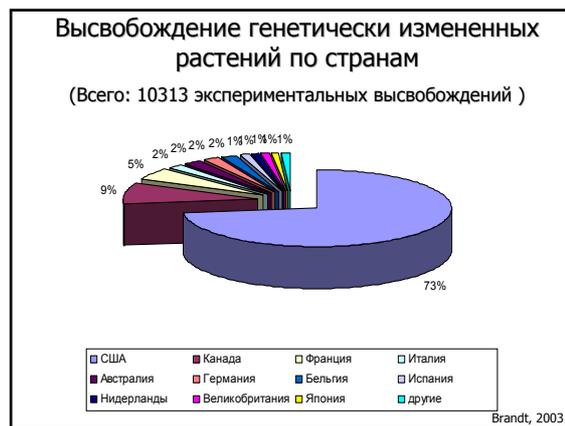
- **Физические методы трансформации**
 - Осмотический шок
 - Электропорация
 - Микроинъекция
 - Стеклообразные нити
 - Биоллистика
- **Прямая трансформация**
 - Удаление верхушки
 - Трансформация пыльцевых зерен
- **Биологическая трансформация**
 - Агробактериальная трансформация
 - Вирусы (TMV, CMV, ACMV)





Биотехнологическая революция

- Первое коммерческое выращивание генетически измененных растений в полевых условиях – **1996**
 - США, Аргентина и Канада
- К **1997** начато коммерческое использование генетически измененных растений в других странах
 - Австралия и Мексика
- Коммерческое выращивание трансгенных растений в ЮАР, Испании и Франции – **1998**
- На сегодняшний день разрешено высвобождение в окружающую среду огромного количества генетически измененных растений как в коммерческих, так и в исследовательских целях
 - Необходимы законы, регулирующие высвобождение ГИО



Необходимость методов идентификации ГИО

- В ЕС принято минимальное пороговое значение при маркировке продуктов питания
- «Пороговое значение» означает, что пищевые продукты должны маркироваться в случае, если содержание материала, полученного из генетически-модифицированных организмов в этих продуктах, превышает 1% индивидуально взятого компонента
- Проблема: Трудность идентификации ГИО после некоторых процессов обработки



Аспекты количественного анализа

- Отбор и приготовление образцов
 - Требуется «репрезентативность» результатов
 - Размер, однородность образцов и пороговые значения
- Должны быть выполнены требования статистического анализа
 - количество материала определяется видом образцов
 - Необработанный материал (например, зерно)
 - Компоненты продуктов питания, подвергшиеся обработке (например, мука)
 - Обработанные продукты питания (например, хлеб)

Эталонная модель

- Соответствующие негативные и позитивные виды контроля (эталон)
 - В соответствии с сертифицированными аналитическими протоколами
 - Зависит от методов определения
- Вид и консистенция эталона должны быть аналогичны образцу
 - зерно, обработанные продукты и т.д.
 - Стабильность с течением времени, гомогенность и определенное содержание ГИО
- Анализ ДНК требует нескольких видов контроля
 - Для анализа белков необходим один стандарт
- Институт эталонных моделей и измерений
 - г. Гиль, Бельгия
- Частные биотехнологические компании работают независимо

Ahmed, 2002

Методы, основанные на анализе белков

- Трансгены кодируют новые белки
- Иммуноферментные методы с использованием антител
 - Идеальны для количественного и качественного анализа
 - Идентификация специфичных белков в сложных образцах
 - Должен быть известен определяемый белок
 - Неспецифическое связывание с белками, сурфактантами (сапонины), фенольными соединениями, жирными кислотами и фосфорсодержащими соединениями
- Поликлональные антитела
 - Чувствительны, но менее специфичны
- Моноклональные антитела
 - Высоко специфичны, но менее чувствительны

Вестерн гибридизация

- Высоко специфичный качественный анализ
- Если «пороговое значение» превышено, вещество можно определить
- Обычно используется для исследований
- Используется метод денатурирующего SDS-PAGE
 - Не требуется предварительного растворения, удаления агглютинатов и случайных белков

Компоненты геля переносятся на твердую подложку или мембрану для переноса



Вестерн гибридизация

- гибридизация мембраны с сухим обезжиренным молоком для предотвращения неспецифического связывания
-
- Промывание бидистиллированной водой ↓
Добавление моноклональных антител → Повторное промывание бидистиллированной водой
- Антитела будут связываться со специфическим белком**
- Добавление маркированных антител к моноклональным антителам (моноклональные антитела теперь можно рассматривать как антигены)
- Окрашивание маркированных антител, связанных с моноклональными антителами
-
- Такой результат получается в случае положительной реакции

Метод ELISA

(применение микропланшетов)

- Лунки в микропланшетах покрыты антителами
 - Количественный, высоко чувствительный, экономичный, с высокой пропускной способностью, идеальный лабораторный анализ
 - Используются неденатурированные белки
 - определение 0,25% ГИО в семенном материале и 1,4% ГИО в продуктах питания



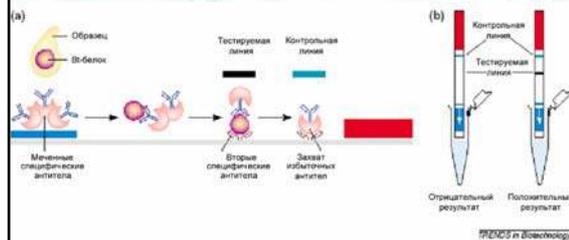
Метод ELISA

(применение пробирок, покрытых антителами)

- Используется тот же подход, что и при ELISA в микропланшетах
- Подходит для полевых исследований
 - Используется для проведения качественных анализов
 - Количественный анализ затруднен в связи с отсутствием эталонов



Использование тест-полосок



- Модификация ELISA с использованием двойных иммобилизованных антител, которые специфичны к экспрессируемому белку, связаны с цветным реагентом и иммобилизованы на нитроцеллюлозную полоску
- Быстрый, экономичный, портативный, хорошо подходит для первичного анализа

Ahmed, 2002

Протокол использования тест-полосок

1. Вырезать листовые диски
2. Добавить буфер и растереть листовой диск в пробирке
3. Поместить тест-полоску в полученную смесь

- Тест на белки CryI(Ab) и CP4 EPSPS
- Растения и семена
- Разрабатываются новые тест-системы

Новые методы иммунодетекции

- Магнитные частицы используются в качестве твердой поддерживающей поверхности
 - Покрываются иммобилизованными антителами и помещены в пробирку
 - Разделены с использованием инертных реагентов
- Точность метода достигается благодаря свободному передвижению частиц и гомогенности раствора



Преимущества и недостатки ELISA

- Большое разнообразие образцов для исследования. Необходимо оптимизировать метод для различных продуктов питания.
 - Выбор параметров и пороговых значений, контрольных образцов и рабочих условий
- Необходима стандартизация каждого протокола
 - Эффективность экстракции, точность и аккуратность результатов, чувствительность (LOD), специфичность, воспроизводимость и достоверность
 - Стандартизированный материал для контроля!
- Проведенные независимые исследования в 38 лабораториях ЕС показали, что при использовании ELISA происходит занижение результатов на 0.9%
- ELISA имеет ряд ограничений при проведении количественных анализов

Методы, основанные на анализе ДНК

- Двухцепочечная ДНК-матрица имеет способность комплементарно связываться в соответствии с последовательностью нуклеотидов
- Рекombинантная ДНК (рДНК) в растениях состоит из нескольких уникальных элементов



35S-промотор CaMV EPSPS CP4 NOS-терминатор *Agrobacterium tumefaciens*

- Типичные компоненты рДНК: промотор, структурный ген и терминирующая последовательность

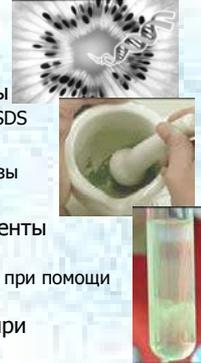
Схема конструкции RoundupReady®

Приготовление образцов ДНК

- Выделение и очистка анализируемых образцов
 - Ограничения в количестве выделяемой ДНК
- Требования к экстракции ДНК
 - Лабораторный образец должен полностью представлять анализируемый образец
 - 100-350 мг
 - ДНК должна быть недеградированной
 - Длина фрагментов и степень повреждения
 - Нагревание, низкие значения pH, нуклеазы, апуринизация, ферментативная деградация
 - ДНК должна быть высокой степени очистки
 - Влияние загрязнителей, присутствующих в образце
 - полисахариды, липиды, полифенолы, химические вещества, использованные при экстракции ДНК

Что необходимо для экстракции ДНК

- Разрушить клеточные стенки
 - Сухой лед или жидкий азот
- Разрушить клеточные мембраны
 - Дeterгенты, например СТАВ или SDS
- Инактивировать нуклеазы
 - ЭДТА связывает Mg^{2+} и протеиназы
- Отделить полисахариды
- Отделить гидрофобные компоненты клеток
 - Например, липиды и полифенолы при помощи органических растворителей
- Отделить ДНК от детергентов при помощи спирта



Саузерн гибридизация

- ДНК ГИО разрезают на фрагменты при помощи специальных ферментов - рестрикционных эндонуклеаз
- Фрагменты ДНК разделяют в агарозном геле
- Разделенные фрагменты ДНК переносят на мембрану
- Мембрану гибридизируют с соответствующими мечеными ДНК-зондами
- Авторадиография



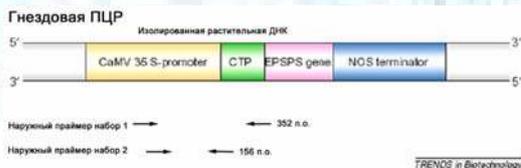
Принципы ПЦР

- Позволяет тысячекратно амплифицировать искомый фрагмент ДНК
- Фермент ДНК-полимераза делает точную копию матрицы
- Синтетические олигонуклеотидные праймеры
 - Позволяют амплифицировать желаемый участок ДНК
 - Праймеры комплементарны ДНК
- При помощи фермента *Taq*-полимеразы получается комплементарная матрица последовательность, расположенная между праймерами
- Количество копий растет экспоненциально
 - В теории...

Циклы	Количество копий
1	1
2	1
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1,024
13	2,048
14	4,096
15	8,192
16	16,384
17	32,768
18	65,536

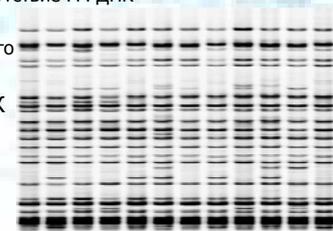
Анализ результатов ПЦР

- Гель-электрофорез – размер
 - Артефакты, связанные с наличием фрагментов с похожей молекулярной массой
- Саузерн гибридизация
 - Достоверно, но требует много времени
- Гнездовая ПЦР увеличивает разрешающую способность
 - 2^{ая} пара праймеров внутри ампликона
- Секвенирование
 - Удобно, но требует много времени



Амплификация полиморфных по длине фрагментов (AFLP)

- Изначально использовалась для распознавания и идентификации различных видов растений
- Можно идентифицировать различные генотипы и незначительное присутствие ГМ ДНК
- Анализ возможен при наличии специфического праймера к рекомбинантной ДНК и опознаваемого геномного праймера



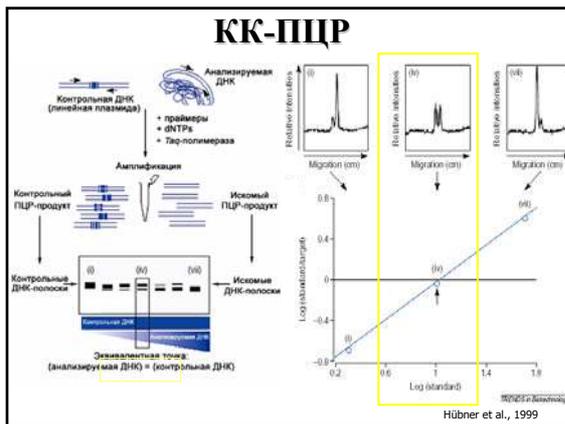
Количественная ПЦР

- Стандартизация ГМ маркера по отношению к специфическому опознаваемому геномному праймеру
 - Комбинация 2-х абсолютно количественных реакций
- В настоящее время используется определение концентрации ДНК в образцах
 - Выявление количества копий обоих сайтов
 - Количество ДНК = % ГИО
- Многокомпонентная ПЦР
 - Обе пары праймеров в одной и той же реакционной смеси
 - Соотношение количества копий рДНК и копий растительных генов
 - Нет необходимости проводить измерения веса или концентрации

Конкурирующая количественная ПЦР (КК-ПЦР)

- Одновременная амплификация искомым последовательности и внутреннего стандарта
 - Поправки на понижение эффективности реакции
 - Неизвестное содержание специфической рДНК в анализируемом образце и известная концентрация контрольного образца
- Лучше всего использовать праймеры, с помощью которых можно амплифицировать две различные по длине последовательности
- Двойная КК-ПЦР с использованием двух различных реакций
 - Специфична по отношению к рДНК и виду растений
 - Например, ген лектина (*le*) из сои
 - Конкурент добавляется в количестве равном 1% ГИО сои (+/-)

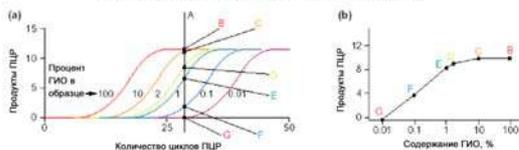
КК-ПЦР



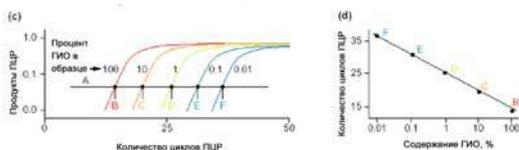
Количественная ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР)

- Во время ПЦР количество амплифицируемых копий экспоненциально нарастает и достигает плато между 30 и 40 циклами
 - Ограниченное количество компонентов в реакционной смеси
 - Потеря точности количественного анализа
- РВ-ПЦР пропорциональна количеству циклов
 - Соответствует экспоненциальной фазе ПЦР
 - Сравнивается известный контрольный образец с неизвестным анализируемым образцом

Конкурирующая количественная ПЦР



Количественная ПЦР в реальном времени



РВ-ПЦР

- Использует циклы реакции для мониторинга и вычислений
- Количественный анализ при помощи окраски, флуоресцентных проб, гидролизных проб и молекулярных световых сигналов
 - Можно отличить артефакты от определяемого продукта
- Требуется минимальное количество начальной ДНК-матрицы – 200 нг для определения < 0.1% ГИО в образце
 - Зависит от размера генома и количества копий трансгена
 - В анализируемом образце желательно присутствие по меньшей мере 36 копий трансгена

Brodman et al., 2002

Сравнение методов идентификации рДНК в продуктах, полученных с использованием ГИО

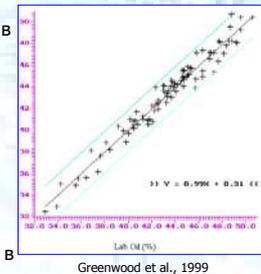
Параметр	Вестерн гибридизация	ELISA	Тест-полоски	Саузерн гибридизация	Качественная ПЦР	КК-ПЦР	РВ-ПЦР
Легкость в применении	Трудный	Средний	Простой	Трудный	Трудный	Трудный	Трудный
Специальные оборудование	Да	Да	Нет	Да	Да	Да	Да
Чувствительность	Высокая	Высокая	Высокая	Средняя	Очень высокая	Высокая	Высокая
Длительность	2 дня	30 - 90 мин	10 мин	6 ч	1.5 дня	2 дня	1 день
Цена образца (\$)	150	5	2	150	250	350	450
Количество анализов	Нет	Да	Нет	Нет	Нет	Да	Да
Полные условия	Нет	Да	Да	Нет	Нет	Нет	Нет
Где применяется	Академические лаборатории	Тест-системы	Полевые исследования	Академические лаборатории	Тест-системы	Тест-системы	Тест-системы

Ahmed, 2002

ИК-спектроскопия

- Широко используется в зернохранилищах
 - Влажность, белки, масла, волокна и крахмал

- ✓ % содержание масел и белков в кукурузе
- ✓ сортировка кукурузы по типу крахмала
- ✓ Общее содержание масел и олеиновых кислот в зернах арахиса
- ✓ % белков в семенах сои
- ✓ Отбор гибридных семян арбуза от инбредных
- ✓ Содержание олеиновых кислот в семенах подсолнечника



ИК-спектроскопия для идентификации ГИО

- Попытка различить Раундап-устойчивую сою от традиционной
 - Целые семена двигались по фиксированному пути длиной в 1 м
- Анализ ~8000 семян с 93% точностью отличал Раундап-устойчивую сою от традиционной
- Необходим калиброванный набор образцов для идентификации ГИО
 - Недостаточное количество образцов-эталонов
- Используется для определения значительных структурных различий
 - Чувствителен к транслокациям С-Н, О-Н и N-H
- Тестируется пристеночная часть семян
 - Лигнин или целлюлоза

Roussel et al., 2003

Заключение

- Тестирование ГИО в рамках международных и национальных законов, регулирующих высвобождение ГИО в окружающую среду, активизирует научные исследования
- Разработаны чувствительные методы анализа ГИО, но для всех методов характерно одно ограничение – низкий уровень детализации (LOD)
- Необходимы доступные, точные и совместимые эталоны для тестирования ГИО

- Такое большое количество ГИО! Что делать?
- Необходимы новые подходы для тестирования образцов
- Биочипы!

Большое спасибо
за внимание!