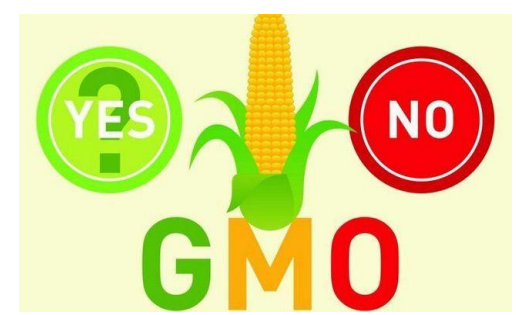


**Методи дослідження харчових
продуктів на вміст ГМО**

G M O  **S ?**



Що таке ГМО?



- Щоб отримати організм з необхідними якостями або поліпшити його первинні властивості, використовується **генна інженерія**.
- **Сутність методики** полягає у введенні в клітини чужорідних або власних змінених генів, що призводить до появи ГМО (генетично модифікованих організмів) і продуктів, створених з ГМД (генетично модифікованих джерел).
- Інакше кажучи, генетично модифікований організм — це такий організм, чия ДНК була змінена за допомогою генної інженерії (такі зміни неможливо отримати в природному середовищі).
- У країнах ЄС, Україні та інших країнах діє нормативна база, призначена для здійснення контролю над поширенням ГМО. Вона включає моніторинг продукції на виявлення генетично модифікованих джерел. З цією метою застосовуються спеціальні методики визначення ГМО.
- Вищевказані дії спрямовані на те, щоб не допустити вживання генетично модифікованих організмів, які не внесені до реєстру і яких немає в списку дозволених. А також, щоб надати споживачеві можливість вибору завдяки інформуванню про склад продукту.

- **Генетично модифікований організм (ГМО)** — організм, генотип якого було змінено за допомогою методів генної інженерії.
- Генетична модифікація відрізняється від природного та штучного мутагенезу саме направленою зміною генотипу. При цьому генетичний матеріал переносять з одного організму в інший, використовуючи технологію рекомбінантних ДНК.
- Якщо при цьому ДНК, яку переносять, походить з іншого виду, отримані організми називають **трансгенними**.



- ГМО використовують в біологічних та медичних дослідженнях, виробництві **ліків, генній терапії** та у сільському господарстві. За допомогою ГМО вивчаються закономірності розвитку деяких захворювань, процеси старіння та регенерації. Генну інженерію використовують для створення нових сортів рослин, стійких до несприятливих умов середовища, гербіцидів та шкідників або рослин, що мають покращені ростові та смакові якості.



Найчастіше вирощують генетично модифіковану сою, кукурудзу та бавовну. Виявлення ГМО в харчових продуктах здійснюється шляхом застосування таких технологій, як ДНК-мікрочип та метод ПЛР. Основними елементами скринінгу можуть слугувати такі послідовності, як 35S промотор, Nos термінатор, rat чи маркерні ДНК послідовності для офіційно затверджених та схвалених для споживання ГМО.



Закон про маркування харчових продуктів

- був прийнятий та набув чинності 6 серпня 2019 року. Згідно з вимогами цього закону, виробники зобов'язані вказувати наявність ГМО на упаковці, якщо їхня частка перевищує встановлену законодавством норму вмісту ГМО в продуктах харчування – 0,9%. Якими ще правовими нормами регулюється ринок ГМ продуктів в Україні і що потрібно знати виробникам – далі в матеріалі.
- Офіційно, в Україні заборонено вирощувати генетично-модифіковану сировину з метою продажу до моменту внесення такої сировини в держреєстр. Разом з тим, немає жодного зареєстрованого сорту ГМ-культури, оскільки діє ЗУ “Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів” (№1103-V).
- Однак на практиці українські аграрії продовжують засівати свої поля ГМ культурами, особливо стійкими до гербіцидів – сою та ріпак.

- Цікаво, що за оцінками учасників ринку, опублікованими на офіційному сайті Міністерства сільського господарства США, приблизно 50-65% сої, вирощуваної українськими виробниками, є генномодифікованою. Посіви ГМ-ріпаку становлять до 12%, кукурудзи – приблизно 1%.
- Разом з тим, українське законодавство не забороняє виводити генетично модифіковані культури, але є нюанси. Зокрема, закон про ГМО дозволяє селекцію ГМ-культур в разі, якщо розробки в цьому напрямку мають науковий інтерес і проводяться на базі лабораторій дослідних інститутів НАНУ.



Нормативні документи про ГМО у харчових продуктах та кормах

- ✓ Картахенський протокол про біобезпеку та
- ✓ Конвенція про біологічне різноманіття, до яких Україна приєдналася у 2012 році
- ✓ Закон України “Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів”.

Вноситься до реєстрів ГМО	Не вноситься до реєстрів ГМО
<ul style="list-style-type: none">■ Сорти сільськогосподарських рослин і породи тварин, створені на основі ГМО■ ГМО-джерела кормів■ ГМО-джерела харчових продуктів	<ul style="list-style-type: none">■ Кормові добавки■ Ветеринарні препарати■ Засоби захисту рослин■ Косметичні засоби■ Медикаменти тощо 

У 2014 році до згаданого закону було внесено зміни, якими відкоригували перелік об'єктів, що підлягають державній реєстрації. Так, в державні реєстри ГМО в Україні зараз вносяться:

- сорти сільськогосподарських рослин і породи тварин, створені на основі ГМО
- ГМО-джерела кормів
- ГМО-джерела харчових продуктів
- До цього обов'язковій держреєстрації також підлягали кормові домішки та ветеринарні препарати, засоби захисту рослин, косметичні засоби і медикаменти, отримані в результаті використання ГМО-сировини. Тобто, після набуття чинності змін до згаданого закону, виробники мають вносити до реєстру тільки джерела ГМО, а не кінцеві продукти, вироблені з них.

- Водночас, чинний закон “Про інформацію для споживачів щодо харчових продуктів” (простіше – **закон про маркування харчових продуктів**) чітко зобов’язує виробників маркувати продукти, що містять генно-модифіковані організми за прикладом країн Євросоюзу.



Тобто, якщо в продуктах харчування, кормах для тварин або ветеринарних препаратах є ГМО, і його вміст перевищує встановлену норму в 0,9%, виробник зобов’язаний вказати це на упаковці. Причому норма ця діє для будь-якого інгредієнта харчового продукту. А ось позначка “Без ГМО”, до якої так звикли споживачі, не є обов’язковим елементом маркування. Її виробник може наносити на свій розсуд. Однак порядок залишається незмінним: відсутність ГМО в продукті необхідно підтвердити в порядку закону про безпеку харчових продуктів.

Норми, які визначають порядок маркування і відстеження ГМ-продуктів, містяться в таких законах:



“Про захист прав споживачів”

“Про ветеринарну медицину”

“Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні ГМО”

“Про основні засади та вимоги до безпеки і якості харчових продуктів”

- Важливим моментом під час поширення та комерціалізації ГМО на світовому ринку є маркування продуктів із вмістом ГМО. Маркування може бути обов'язковим чи добровільним. У Канаді та США маркування є добровільним, тоді як у Європі всі продукти, які містять більше ніж 0.9 % схвалених до використання ГМО мають маркуватися. В Україні маркуванню підлягають не тільки продукти отримані з ГМО, а також харчові добавки, отримані за допомогою ГМО. Крім того, Україна стала першою державою у світі, яка зобов'язала виробників та імпортерів харчових продуктів вказувати позначення «без ГМО» в маркуванні всіх, без винятку, харчових продуктів, навіть тих, у яких ГМО не може бути ні теоретично, ні практично.



Методи виявлення ГМО

Використання тест-смужок

Метод імуно-ферментного аналізу (ІФА)

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Метод мікрочипування

МЕТОД ПЛР (полімеразно-ланцюгова реакція)

Принцип методу

заснований на тому, що ПЛР ампліфікує специфічні послідовності ДНК, присутні в зразку, що дозволяє виявити і кількісно оцінити ГМО.

Метод ґрунтується

на використанні специфічних праймерів, які закріплюються на цільових послідовностях ДНК, а також ферменту ДНК-полімерази для синтезу нових ланцюгів ДНК

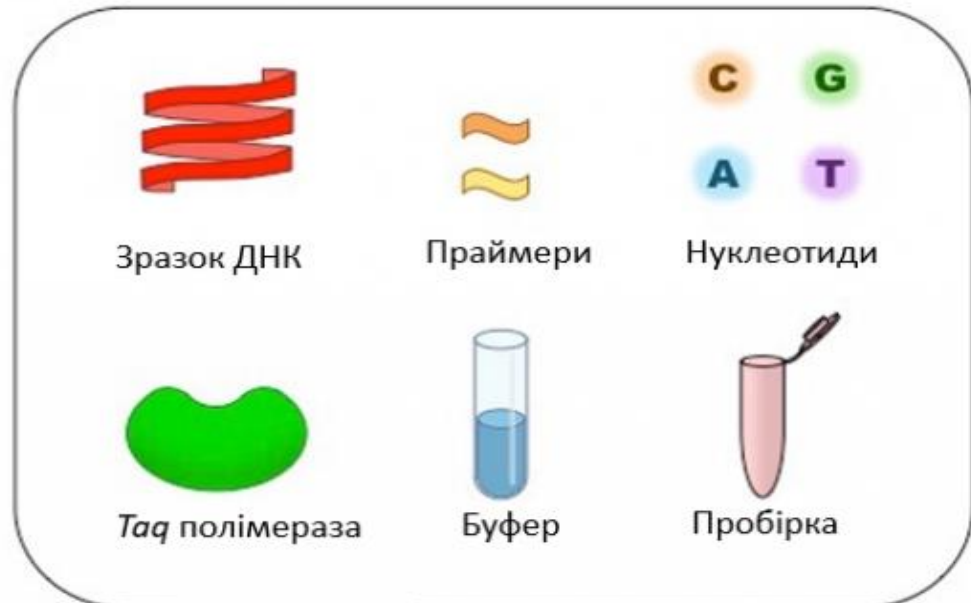


Проведення методу складається з наступних етапів:

- **Виділення нуклеїнових кислот із зразка.** ДНК виділяють із зразка харчового продукту або корму за допомогою відповідного методу екстракції. Цей етап екстракції має вирішальне значення для ізоляції цільової ДНК з матриці зразка і видалення потенційних інгібіторів, які можуть перешкоджати ампліфікації ПЛР;
- **Створення праймерів.** Специфічні праймери призначені для приєднання до унікальних послідовностей ДНК, які є характерними для кожного виду ГМО. Ці праймери оточують цільову ділянку ДНК, яку потрібно ампліфікувати під час ПЛР;
- **Ампліфікація.** Реакційна суміш проходить серію температурних циклів у термоциклері (денатурація, реплікація тощо). Ці цикли повторюються багато разів (зазвичай 20-40 циклів), що призводить до експоненціальної ампліфікації цільової послідовності ДНК;
- Після ампліфікації ПЛР продукти аналізують за допомогою **гель-електрофорезу**. Продукти ПЛР розділяють за розміром, коли вони мігрують через агарозний гель під дією електричного поля. Фрагменти ДНК очікуваного розміру візуалізуються за допомогою барвника ДНК та УФ-світла.
- **Виявлення та кількісне визначення.** Присутність і кількість ГМО в зразку визначають шляхом порівняння розміру та інтенсивності смуг продуктів ПЛР з відомими стандартами або контролями. Кількісна оцінка може бути досягнута за допомогою кількісної ПЛР (qPCR) шляхом вимірювання флуоресценції, що випромінюється під час ампліфікації в режимі реального часу.

ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

Компоненти для ПЛР

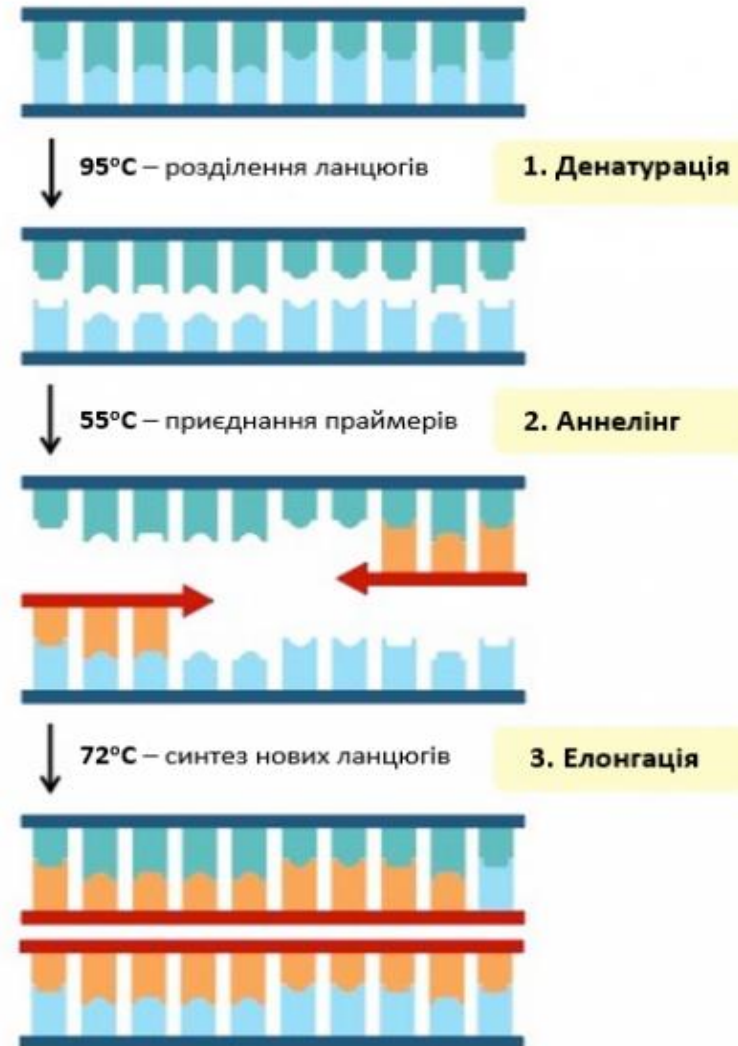


Термоциклер



ПЛР цикл

Схема ПЛР (один цикл)



Метод імуно-ферментного аналізу (ІФА, ELISA)

- **Принцип дії**

- ✓ ІФА заснований на принципі зв'язування антиген-антитіло.
- ✓ В аналізі ГМО цільовий аналіт (наприклад, білок або інший специфічний для ГМО компонент) слугує антигеном, тоді як специфічні антитіла використовуються для виявлення.
- ✓ Зв'язування антигену з іммобілізованим антитілом виявляється за допомогою ферментно-зв'язаного вторинного антитіла, яке створює вимірюваний сигнал.
- ✓ Методом ІФА також можна проводити визначення мікотоксинів, алергенів, залишків антибіотиків, деяких вітамінів та патогенів.

Метод імуно-ферментного аналізу (ІФА, ELISA)



Аналізатор імуноферментний ELX 800

Етапи ІФА-аналізу:

- першим кроком в ІФА-аналізі є **підготовка зразка**. Зразки харчових продуктів або кормів зазвичай гомогенізують і екстрагують, щоб виділити цільовий аналіт (наприклад, білок) з матриці. Потім екстрагований зразок розводять до відповідної концентрації для аналізу;
- мікروتитрувальні планшети покривають антитілами, специфічними до цільового аналіту. Планшети з покриттям промивають, щоб видалити незв'язані антитіла, і додають блокуючі агенти для мінімізації неспецифічного зв'язування;
- розведені екстракти зразків і стандарти, що містять відомі концентрації цільового аналіту, додають до покритих мікротитрованих планшетів. Планшети інкубують, щоб цільовий аналіт зв'язався з антитілами захоплення, іммобілізованими на поверхні планшета;
- після інкубаційного періоду планшети промивають, щоб видалити незв'язані компоненти зразка і забруднюючі речовини;
- у лунки додають вторинне антитіло, кон'юговане з ферментом (наприклад, пероксидазою хрому або лужною фосфатазою). Це вторинне антитіло специфічно зв'язується з цільовим аналітом. Після подальшого періоду інкубації планшети знову промивають, щоб видалити незв'язане вторинне антитіло;
- у лунки додають розчин субстрату, специфічний до ферментного кон'югату. Фермент прискорює колориметричну або хемілюмінесцентну реакцію з субстратом, виробляючи сигнал, який можна виявити (наприклад, зміна кольору або люмінесценція), прямо пропорційний кількості цільового аналіту, присутнього в зразку;
- сигнал, що генерується в кожній лунці, вимірюється за допомогою рідера для мікропланшетів, який кількісно оцінює інтенсивність сигналу. Інтенсивність сигналу порівнюється зі стандартною кривою, згенерованою на основі відомих концентрацій цільового аналіту, щоб визначити концентрацію аналіту в зразку.

Схема проведення ІФА:

(1)



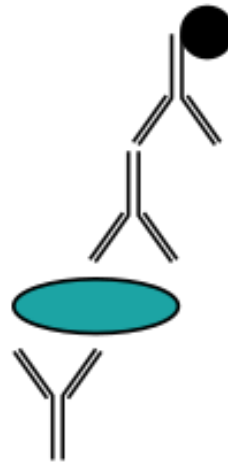
(2)



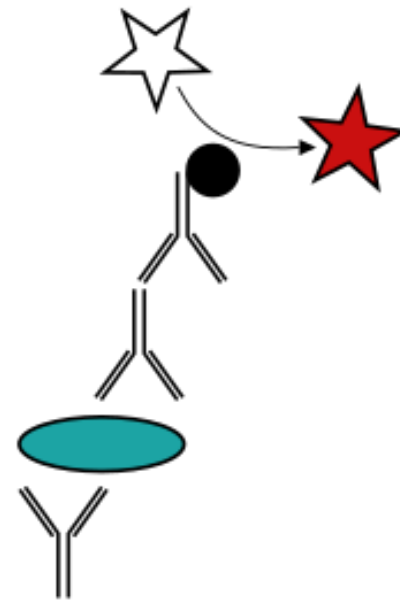
(3)



(4)



(5)



Використання тест-смужок (тестів латерального потоку)

✓ Принцип дії

- Коли тест-смужку поміщають в екстракт зразка, білок ГМО, присутній в екстрактах зразків зв'язується з антитілом, міченим невеликим об'ємом наночастинок золота, і комплекс рухається вгору за рахунок капілярної дії. Потім комплекс зв'язується з антитілом, нанесеним на тест-смужку, в результаті чого утворюється рожево-фіолетовий колір тестової лінії. Коли комплекс рухається далі вгору, він зв'язується з контрольною лінією, в результаті чого з'являється рожево-фіолетовий колір контрольної лінії. За відсутності білка ГМО тестова лінія не з'являється, оскільки жоден комплекс не зв'язується з тестовою лінією, в той час як контрольна лінія набуває рожево-фіолетового кольору, що свідчить про правильність протоколу тестування.
- Інтенсивність забарвлення тестової лінії може бути використана для кількісного вимірювання кількості ГМО, присутнього в зразках зерна. Для кількісного оцінювання використовують спеціальні рідери.

Чутливість тест-смужки показує вище якої концентрації ГМО результат буде позитивним.

Процедура визначення займає лише 10 хвилин і виглядає наступним чином:

- ✓ Зважте зразок
- ✓ Подрібніть у закритій ємності млина або блендера
- ✓ Додайте очищену воду у кількості згідно інструкції
- ✓ Інтенсивно струсіть зразок з водою і дайте відстоятись
- ✓ Відберіть ~ 0,5 мл зразка за допомогою піпеток для перенесення і перенесіть його в мікропробірку на 1,5 мл
- ✓ Помістіть тест-смужку у пробірку із зразком і залиште на 5 хвилин
- ✓ Зчитайте результат

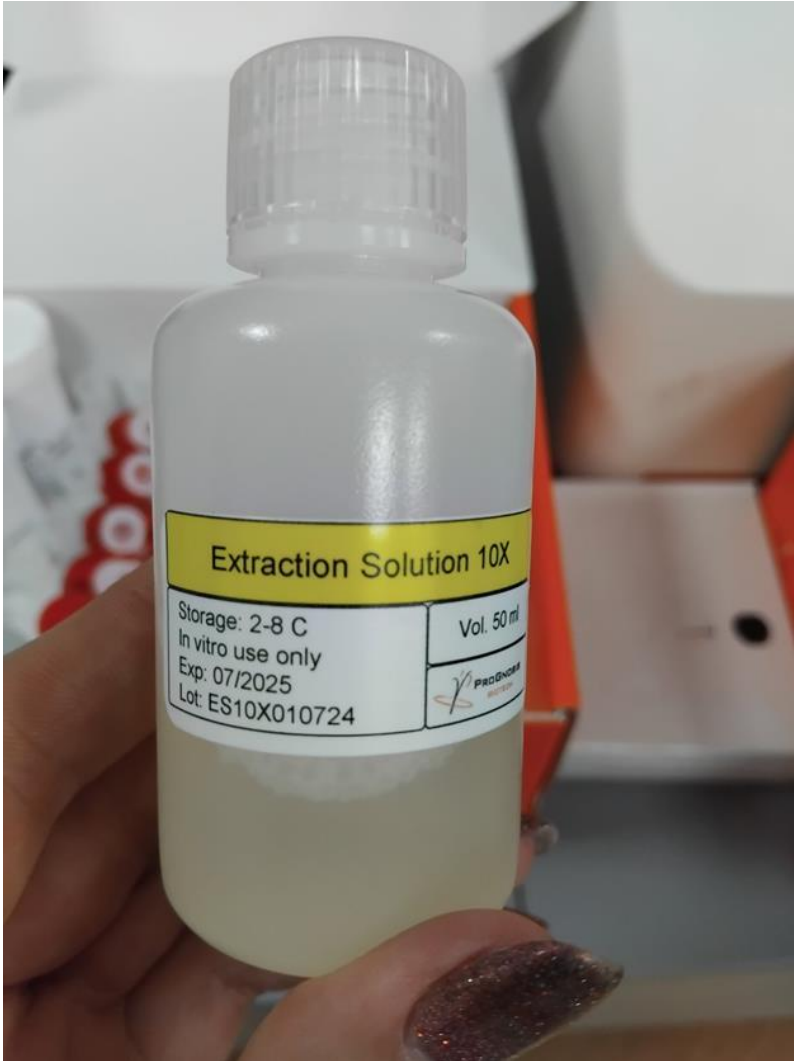
Прилад для визначення ГМО тест-смужковим методом



Реактиви для досліджень тест-смужковим методом:



ТЕСТ-СМУЖКОВИЙ МЕТОД



Екстракційний розчин
як альтернатива
шкідливим
розчинниками



Вся ємність
розводиться на 500 мл
деіонізованої води
(термін зберігання 1
рік)

Тест-смужковий метод



15 мл екстракційного розчину

+ 5 г подрібненого зерна

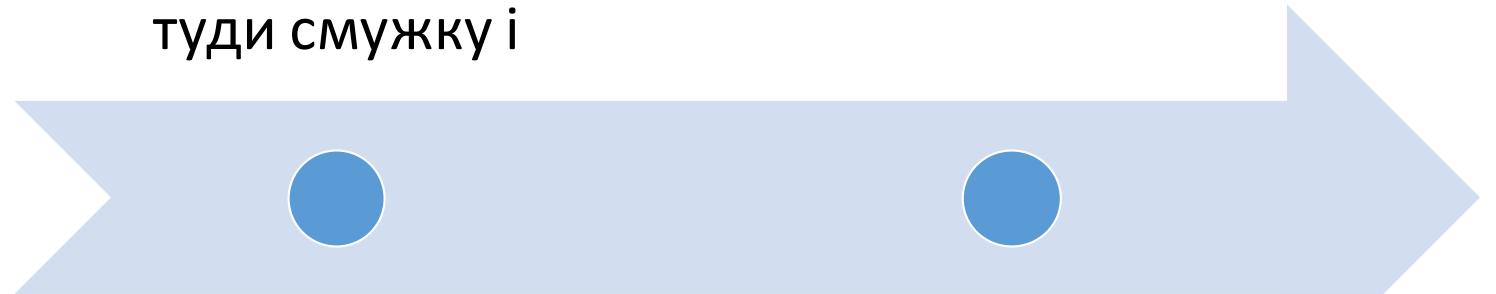
поміщаємо у центрифужні пробірки на 50 мл

перемішуємо (гомогенізуємо) 2 хв

ТЕСТ-СМУЖКОВИЙ МЕТОД



Відбираємо 100 мл,
у спеціальну
таблетку, опускаємо
туди смужку і



чекаємо 3 хв при
кімнатній
температурі та
зчитуємо результат



Якісне визначення:

2 червоні лінії – позитивний результат
(наявність)



Для кількісного визначення:

Встановлюємо лот у прилад, який
підключений до спеціальної програми
(доступно на смартфоні)



МЕТОД МІКРОЧИПУВАННЯ:

- ✓ ДНК-мікрочіпи (ДНК-чіпи, мікроареї) – це комплекс технологічно-інноваційних методик у практичній біології та медицині, спрямований здебільшого на диференційне вивчення експресії генів, тобто – механізмів, що супроводжують процес змін наслідкової інформації з елементарної нуклеотидної послідовності у функціональний продукт (білок або РНК).
- ✓ Революційною перевагою даного методу є можливість ідентифікації та кількісного аналізу експресії тисяч генів одночасно, що дозволяє суттєво підвищити оперативність проведення масштабних досліджень






МЕТОД МІКРОЧИПУВАННЯ:



- ❑ В основі методу ДНК-мікрочіпів лежить механізм гібридизації досліджуваних молекул ДНК до відомих мішеней, розташованих на поверхні чіпу. Для експерименту використовують попередньо мічені флуоресцентними речовинами об'єкти, що в подальшому дозволяє за інтенсивністю флуоресценції кожної області чіпу оцінити вміст комплементарних до неї послідовностей у пробі
- ❑ Результатом досліджень за методикою ДНК-мікрочіпів є зображення визначеного флуоресцентного сигналу, який одержують у формі фото з використанням фотоімейджерів або шляхом поступового сканування сигналу з допомогою спеціально розроблених для мікроареїв сканерів.
- ❑ Серйозною проблемою методики є поява на зображеннях шумів, пов'язаних зі стерильністю, якістю мікрочіпа і проб, а також молекулярними взаємодіями.
- ❑ Для того щоб отримати “чисте” зображення використовуються комплексні підходи для його попередньої нормалізації та трансформацій.



ДЯКУЮ ЗА УВАГУ