

**Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Российский университет дружбы народов»**

2022

**В.С. Орлова, С.В. Ионов, Т.Н. Ледащева**

**Молекулярно-биологические аспекты идентификации  
генетически модифицированных источников  
с применением биологического микрочипа**



Учебное пособие

УДК 579.6  
ББК 28.4  
О 664

Рецензенты: Маторин Дмитрий Николаевич – д.б.н., проф., кафедра биофизики МГУ.  
Мазина Светлана Евгеньевна – к.б.н., старший научный сотрудник,  
кафедра радиохимии МГУ.

**Орлова, Валентина Сергеевна**  
**Ионов, Степан Викторович**  
**Ледащева, Татьяна Николаевна**

О 664 Молекулярно-биологические аспекты идентификации генетически  
модифицированных источников с применением биологического микрочипа. Учебное  
пособие – М.: Мир науки, 2022. – Режим доступа: [https://izd-  
mn.com/PDF/04MNNPU22.pdf](https://izd-mn.com/PDF/04MNNPU22.pdf) – Загл. с экрана.

ISBN 978-5-6047490-1-2

Цель настоящего издания – систематическое изложение молекулярно-биологических аспектов, технологических приемов и методик идентификации генетически модифицированных источников с применением биологического микрочипа.

Пособие содержит базовые понятия молекулярной биологии клетки; проблемы и принципы выделения ДНК, полимеразной цепной реакции и гибридизации; основы технологии создания генетически модифицированных организмов. Кроме этого, читатель имеет возможность кратко ознакомиться с основными методами анализа генетически модифицированных источников, которые существуют сегодня в мире. Особое внимание уделено принципам работы испытательной лаборатории в системе государственного стандарта. В приложении дано подробное описание работы программы сканирования и анализа изображения на генных чипах.

Пособие предназначено для подготовки специалистов в рамках курсов «Микробиология и генетика», «Молекулярная биология» и др., но может быть полезен и опытным специалистам-практикам, работающим в сертифицированных лабораториях.

ISBN 978-5-6047490-1-2

© Орлова Валентина Сергеевна  
© Ионов Степан Викторович  
© Ледащева Татьяна Николаевна  
© Российский университет дружбы народов, 2022  
© ООО Издательство «Мир науки», 2022

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	5
<b>1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ.....</b>	<b>6</b>
1.1 БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ .....	6
1.2 МОЛЕКУЛЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА. МЕХАНИЗМЫ ХРАНЕНИЯ И РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ .....	6
<i>Структура и функции белков.....</i>	<i>8</i>
<i>Особенности строения и экспрессии генов про- и эукариот .....</i>	<i>9</i>
<i>Литература .....</i>	<i>10</i>
<b>2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК .....</b>	<b>11</b>
2.1 ЭТАПЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК .....	11
<i>Лизис .....</i>	<i>12</i>
<i>Очистка ДНК.....</i>	<i>12</i>
<i>Преципитация ДНК.....</i>	<i>15</i>
2.2 ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННОЙ ДНК.....	15
2.3 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК В ПРЕПАРАТАХ.....	16
<i>Спектрофотометрия .....</i>	<i>16</i>
<i>Электрофорез в агарозном геле.....</i>	<i>16</i>
<i>Флюориметрический метод .....</i>	<i>17</i>
2.4 МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК .....	17
<i>Выделение ДНК из растительного материала (микрометод со СТАВ) .....</i>	<i>17</i>
<i>Экспресс-метод выделения ДНК из растительной ткани.....</i>	<i>18</i>
<i>Выделение ДНК из продуктов питания .....</i>	<i>19</i>
<i>Литература .....</i>	<i>20</i>
<b>3. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ.....</b>	<b>21</b>
3.1 ПРИНЦИП ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ .....	21
3.2 ПРОГРАММИРУЕМЫЕ ТЕРМОСТАТЫ .....	23
3.3 КОМПОНЕНТЫ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ .....	23
<i>ДНК-полимеразы .....</i>	<i>23</i>
<i>Олигонуклеотидные праймеры. Принципы подбора.....</i>	<i>24</i>
<i>Буфер .....</i>	<i>25</i>
<i>Матрица .....</i>	<i>25</i>
3.4 ВЕЩЕСТВА, СТИМУЛИРУЮЩИЕ ПЦР, И ЕЕ ИНГИБИТОРЫ .....	25
3.5 АМПЛИФИКАЦИЯ И КОНТРОЛЬ ЗА ПРОХОЖДЕНИЕМ ПЦР .....	26
<i>Параметры циклов ПЦР .....</i>	<i>26</i>
<i>Анализ продуктов амплификации .....</i>	<i>27</i>
<i>Ассиметричная ПЦР.....</i>	<i>27</i>
<i>Литература .....</i>	<i>28</i>
<b>4. ТЕХНОЛОГИЯ ГЕННЫХ ЧИПОВ .....</b>	<b>29</b>
4.1 ТИПЫ МИКРОЭРРЕЕВ.....	29
<i>Генные чипы .....</i>	<i>29</i>
<i>Белковые чипы .....</i>	<i>30</i>
<i>Микроэрреи на основе цитологических образцов .....</i>	<i>30</i>
<i>Микроэлектронные генные чипы .....</i>	<i>31</i>
4.2 СОЗДАНИЕ МИКРОЭРРЕВ НА ПРИМЕРЕ ГЕННЫХ ЧИПОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ .....	31
<i>Набор уникальных генов.....</i>	<i>31</i>
<i>Создание зондов на базе кДНК.....</i>	<i>31</i>
<i>Разработка набора зондов для олигонуклеотидных генных чипов .....</i>	<i>33</i>
4.3 ПЕЧАТЬ ГЕННЫХ ЧИПОВ.....	34
<i>Технология струйной печати .....</i>	<i>34</i>
<i>Контактная печать (пин-принтинг).....</i>	<i>35</i>

4.4	ИММОБИЛИЗАЦИЯ ОБРАЗЦОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ЧИПА.....	36
4.5	Гибридизация .....	36
	<i>Системы, используемые для мечения образца .....</i>	36
4.6	СЧИТЫВАНИЕ ИНФОРМАЦИИ .....	37
	<i>Системы прямого считывания .....</i>	38
	<i>Сканирующие системы .....</i>	38
4.7	ПРИМЕНЕНИЕ ДНК ЧИПОВ.....	39
	<i>Исследование дифференциальной экспрессии генов .....</i>	39
	<i>Генное картирование .....</i>	39
	<i>Анализ многокомпонентных биологических систем .....</i>	39
<b>5.</b>	<b>ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК.....</b>	<b>41</b>
5.1	КЛОНИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК .....	41
	<i>Встраивание переносимого гена в вектор. Структура прокариотических векторов .....</i>	41
	<i>Трансформация .....</i>	43
	<i>Отбор трансформантов и анализ экспрессии перенесенного гена .....</i>	43
	<i>Структура эукариотических векторов.....</i>	44
5.2	ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ .....	44
	<i>Методы переноса генов в клетки растений .....</i>	44
	<i>Принципы конструирования векторов для трансформации растений.....</i>	47
5.3	ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ.....	49
	<i>Устойчивость к гербицидам .....</i>	49
	<i>Устойчивость к патогенам .....</i>	50
	<i>Устойчивость к вирусам.....</i>	51
	<i>Трансгенные растения с комбинированной устойчивостью и признаком мужской стерильности .....</i>	51
	<i>Растения с улучшенными потребительскими качествами .....</i>	52
	<i>Изменение пищевой ценности растений .....</i>	52
	<i>Изменение окраски цветков.....</i>	52
	<i>Использование трансгенных растений для производства белков терапевтического назначения .....</i>	53
5.4	ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ .....	53
5.5	РЕКОМБИНАНТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ .....	54
5.6	ПРОБЛЕМЫ БЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ.....	54
	<i>Литература .....</i>	55
<b>6.</b>	<b>МЕТОДЫ АНАЛИЗА ГМИ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ.....</b>	<b>56</b>
	<i>Литература .....</i>	61
	<b>ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ И КОНТРОЛЯ .....</b>	<b>62</b>
	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ. МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ ГОСТ 34150-2017 "БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ. СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ. МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ (ГМО) РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА" (ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ ПРИКАЗОМ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ ОТ 4 АВГУСТА 2017 Г. N 805-СТ).....</b>	<b>63</b>

## Введение

Успехи молекулярной биотехнологии служат источником оптимистических прогнозов прогресса в различных областях человеческой деятельности, направленной на повышение качества жизни населения. Сегодня с молекулярными технологиями связывают возможность решения таких насущных вопросов, как: -возможность точной диагностики и лечения многих заболеваний; -повышение урожайности сельскохозяйственных культур путем создания растений, устойчивых к неблагоприятным факторам среды и вредителям;

-создание микроорганизмов, продуцирующих различные химические соединения и лекарственные препараты;

-создание пород животных с улучшенными признаками;

-переработка отходов.

Однако единого мнения относительно безопасности распространения и употребления в пищу генетически модифицированных источников до сих пор не существует. Обеспокоенность общественности привела к утверждению довольно жестких требований, которым должны удовлетворять биотехнологические продукты, поступающие на рынок, и появлению во многих странах законодательных актов, регулирующих использование и/или маркировку пищевых продуктов, содержащих ГМИ.

Для утверждения единых критериев и методической базы по определению уровня содержания генетических изменений в продуктах питания в России был введен ГОСТ Р-52174-2003 на методы идентификации ГМИ растительного происхождения, который предусматривает использование для идентификации генетически модифицированных источников биологических микрочипов. С 1 января 2019 г. этот стандарт был отменен в связи с принятием и введением в действие ГОСТ 34150-2017 для добровольного применения в РФ, (при этом основные положения ГОСТ Р-52174-2003 сохранились и в новом стандарте).

Цель настоящего издания – систематическое изложение молекулярно-биологических аспектов идентификации ГМИ с применением биологического микрочипа в соответствии с ГОСТ 34150-2017, а также технологических приемов и методик, лежащих в основе государственного стандарта.

Сборник состоит из четырех основных разделов. В первом изложены базовые понятия молекулярной биологии клетки (структура и функции биомолекул, механизмы экспрессии генов); во втором детально рассмотрены проблемы и принципы выделения ДНК, полимеразной цепной реакции и гибридизации. В третьем разделе изложены основы технологии создания генетически- модифицированных организмов. Кроме этого, читатель имеет возможность кратко ознакомиться с основными методами анализа ГМИ, которые существуют сегодня в мире. Особое внимание уделено принципам работы испытательной лаборатории в системе ГОСТ 34150-2017 и общими положениями государственного стандарта. В приложении дано подробное описание работы программы сканирования и анализа изображения на генных чипах.

Пособие построено таким образом, что им могут пользоваться как начинающие, так и опытные специалисты – практики, работающие в сертифицированных лабораториях, занимающихся анализом ГМИ.

# 1. Молекулярные основы наследственности

## 1.1 Биологические системы

Объектами молекулярных технологий являются самые разнообразные биологические системы: микроорганизмы (бактерии и дрожжи), клеточные линии насекомых, растений и животных, вирусы и многоклеточные живые организмы, а также субклеточные структуры.

**Клетки** – это структурные и функциональные единицы живых организмов. Клетки разных типов обладают некоторым сходством основных структур. Каждая клетка окружена *плазматической мембраной*, а внутреннее пространство клеток заполнено *цитоплазмой*. В цитоплазме всех клеток присутствуют *рибосомы*, функция которых состоит в обеспечении синтеза белков.

Существует два больших класса клеток: **прокариотические** и **эукариотические**. Основой такого деления служит наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК. К первой группе относятся бактериальные клетки, ко второй – клетки дрожжей, растений и животных. Более подробно различия между этими группами живых организмов представлены в Таблице 1.

Таблица 1.

Сравнение клеток прокариотических и эукариотических организмов

Прокариоты	Эукариоты
Размер клетки 1-10 мкм	Размер клетки 10-100 мкм
Кольцевая ДНК находится в цитоплазме	В клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы клеточной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре
В клетке нет цитоплазматических органелл и цитоскелета	В цитоплазме содержатся органеллы: митохондрии, аппарат Гольджи, хлоропласты у растений, цитоскелет
РНК и белки синтезируются в цитоплазме	Синтез и процессинг РНК проходят в ядре, белки синтезируются в цитоплазме
Бинарное деление	Митоз или мейотическое деление

**Вирусы** представляют собой образующиеся биологическим путем надмолекулярные комплексы. Вирусная частица состоит из молекулы нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и окружающей ее защитной оболочки, построенной из белковых молекул.

Вирусы способны заражать специфические для них клетки, заставляя их воспроизводить вирусные частицы в соответствии с генетической информацией, содержащейся в вирусной нуклеиновой кислоте. Роль клеток – хозяев могут играть клетки растений, животных или бактерии.

## 1.2 Молекулы генетического аппарата.

### Механизмы хранения и реализации генетической информации

Вся информация о строении и функционировании любого живого организма содержится в закодированном виде в его генетическом материале, основу которого составляет **дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)**.

ДНК большинства организмов – это длинная полимерная молекула, которая состоит из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей, образующих двойную спираль. Их

мономерной единицей является **нуклеотид**, который состоит из *азотистого основания*, *дезоксирибозы* и *фосфатной группы*.

Соседние нуклеотиды в цепи связаны *фосфодиэфирными связями*, а цепи удерживаются вместе с помощью водородных связей, образующихся между комплементарными основаниями. При этом аденин (А) образует водородные связи только с тиминам (Т), гуанин (G) — только с цитозином (С) (рис. 1.1). В клетке ДНК обычно находится в комплексе с белками.

Близкородственными ДНК молекулами являются **рибонуклеиновые кислоты (РНК)**, которые отличаются от ДНК в основном тем, что вместо дезоксирибозы содержат рибозу и чаще имеют одноцепочечную структуру. В состав РНК вместо тимина входит урацил (U).

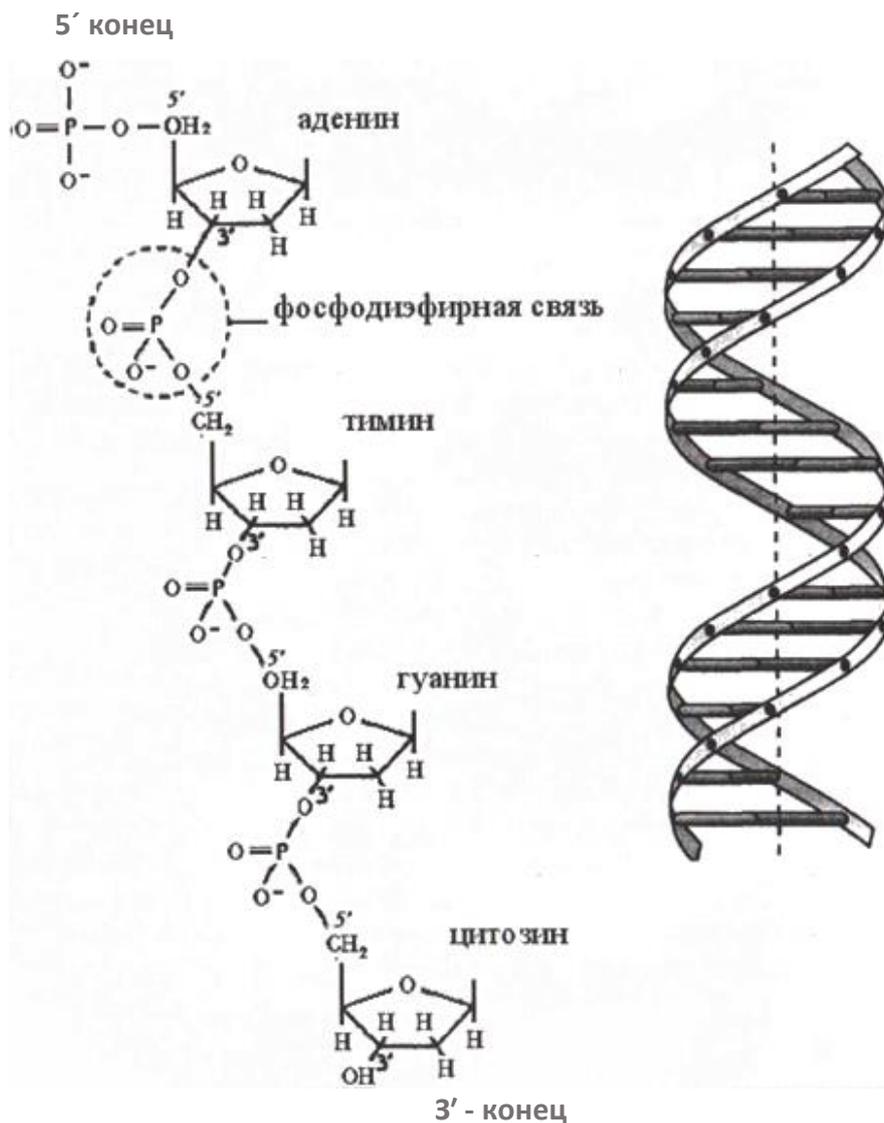


Рис. 1.1. Модель двойной спирали ДНК.

Генетическая информация о структуре отдельных белков и нуклеиновых кислот заключена в молекуле ДНК в виде специфических последовательностей нуклеотидов, называемых **генами**. Подавляющее большинство последовательностей ДНК составляют так называемые *структурные гены*, на которых синтезируется **мРНК** (**матричная** или **информационная**).

Остальные кодирующие последовательности приходятся на долю **тРНК** (транспортной) и **рРНК** (рибосомальной). Информация, содержащаяся в структурных генах, расшифровывается в ходе двух последовательных процессов: синтеза мРНК (**транскрипции**)

и синтеза белка (**трансляции**) (рис. 1.2). Некоторые вирусы способны осуществлять передачу информации в обратном направлении, от – РНК к ДНК, посредством процесса **обратной транскрипции**.

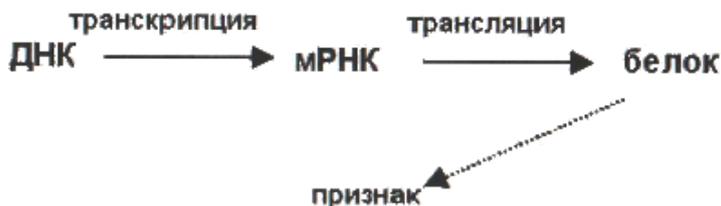


Рис.1.2. Информационная связь между ДНК, РНК и белком.

Последовательность аминокислот в белках определяется порядком расположения дезоксирибонуклеотидов в генах, кодирующих белки, точнее - последовательностью рибонуклеотидов в мРНК-транскриптах. Информационная связь между нуклеотидными и аминокислотными последовательностями осуществляется с помощью **генетического кода**.

**Кодоны** для аминокислот представляют собой специфические тройки нуклеотидов (**триплеты**). В таком коде почти каждой аминокислоте соответствуют несколько кодонов (например, аминокислота валин может кодироваться триплетами GTT, GTC, GTA и GTG).

Процесс реализации генетической информации, закодированной в структуре ДНК, на уровне РНК и белков называют **экспрессией генов**. Сначала на определенном участке ДНК синтезируется мРНК. Этот процесс осуществляется при помощи **РНК-полимераз** - ферментов, катализирующих синтез цепи РНК путем копирования нуклеотидной последовательности одной цепи ДНК с помощью комплементарного спаривания оснований. На этом уровне обычно происходит *регуляция экспрессии* генов. Затем в ходе согласованной работы многокомпонентной системы при участии транспортных РНК, мРНК, ферментов и различных белковых факторов осуществляется синтез белковой молекулы.

Трансляцию молекул мРНК в белки катализируют рибонуклеопротеиновые частицы (рибосомы), содержащие более 50 различных белков и три вида молекул РНК. **Синтез белковой цепи** начинается с присоединения рибосом к матричной РНК. Белковая цепь удлиняется на одну аминокислоту, когда рибосома продвигается вдоль молекулы ДНК на один кодон. Ключевой момент трансляции - перевод генетической информации, закодированной в триплетных кодонах мРНК, в специфические аминокислоты — зависит от комплементарного спаривания оснований. Каждая аминокислота присоединяется к особой, родственной только ей тРНК, содержащей триплет (**антикодон**), комплементарный кодоновому триплету в мРНК. Благодаря спариванию оснований между кодоном и антикодоном нужная аминокислота занимает свое место в растущей полипептидной цепи.

В структуре ДНК закодирована информация и о механизмах ее собственного удвоения. Процесс удвоения ДНК называется **репликацией**. В нем участвует множество различных белков, прежде всего **ДНК-полимеразы**. Каждая из цепей ДНК служит матрицей для синтеза комплементарной цепи. Комплементарность оснований противоположных цепей гарантирует идентичность новосинтезированной и исходной ДНК.

## Структура и функции белков

Клетки содержат сотни и тысячи различных белков, предназначенных для выполнения самых разных биологических функций. Они служат катализаторами разнообразных биохимических реакций, осуществляют внутри-межклеточный транспорт веществ, регулируют проницаемость клеточных мембран, из них строятся различные структурные элементы клеток. Белковые молекулы обеспечивают метаболическую, энергетическую, двигательную функцию клетки; защиту от инфекции и токсинов, регулируют синтез остальных генных продуктов. Зрелые белки состоят из одной или нескольких полипептидных цепей,

каждая из которых, в свою очередь - представляют собой длинный, неразветвленный полимер, содержащий от 100 до 1000 и более аминокислотных остатков, соединенных друг с другом *пептидными связями*. Все белки построены из набора одних и тех же 20-ти аминокислот, расположенных в строго определенной для каждого белка последовательности. Порядок расположения аминокислот называется **первичной структурой** белка. Полипептидные цепи могут укладываться в регулярные структуры, называемые **вторичными**. Пространственная организация белковой молекулы определяется ее **третичной** и **четвертичной структурой**. Нарушения (*мутации*) в структуре кодирующей последовательности гена ведут к изменению первичной аминокислотной последовательности и, как следствие, влияют на способность белковой молекулы к формированию вторичной, третичной и четвертичной структур с полноценной биологической активностью.

## Особенности строения и экспрессии генов про- и эукариот

Кодирующая последовательность гена снабжена элементами, необходимыми для начала правильной транскрипции (**промотор**) и для образования правильного 3' конца зрелой РНК (**терминатор**). Кроме того, у большинства генов есть дополнительные 3' и 5' - концевые регуляторные последовательности.

У **прокариот** структурный ген представляет собой непрерывный участок молекулы ДНК. Транскрипция начинается со связывания РНК-полимеразы с промотором, и далее последовательно копируется весь структурный ген с образованием функциональной мРНК (рис.1.3).

В бактериальном геноме гены почти непрерывно следуют один за другим по всей длине молекулы ДНК, а в некоторых случаях даже перекрываются. Гены, кодирующие ферменты одного метаболического пути, или ферменты, активности которых, так или иначе, связаны между собой, часто образуют опероны. Обычно оперон находится под контролем единственного промотора, и при его транскрипции образуется единственная молекула мРНК, кодирующая несколько белков.

Белок-кодирующие последовательности ДНК у **эукариот** прерываются некодирующими участками ДНК. Некодирующие сегменты называются **интронами**, а кодирующие участки генов - **экзонами**. После завершения транскрипции интроны удаляются из первичного транскрипта, а экзоны сшиваются друг с другом. Этот процесс получил название **сплайсинга** (рис.1.3).

Число интронов у разных генов может варьировать. Как правило, на долю интронов приходится намного больше ДНК, чем на долю экзонов. Обычно длина экзонов составляет от 150 до 200 нуклеотидов, а длина интронов от 40 до 10000 нуклеотидов. Иногда сплайсинг РНК может проходить по альтернативному пути. Например, в одной ткани функциональная мРНК может образовываться в результате соединения всех экзонов первичного транскрипта (1-2-3-4-5), а в другой - только части экзонов (2-4-6), что приведет к образованию другой функциональной мРНК. Благодаря альтернативному сплайсингу в разных тканях могут образовываться разные продукты одного и того же структурного гена.

Эукариотические мРНК содержат на своем 3' конце "хвост" из 100-200 последовательно присоединенных остатков аденозина - так называемый polyA-хвост. Кроме того, на 5'-конце молекулы мРНК присутствует "кэп", представляющий собой остаток 7-метилгуанозина, присоединенный при помощи необычной трифосфатной связи. У прокариотических мРНК данные элементы отсутствуют.

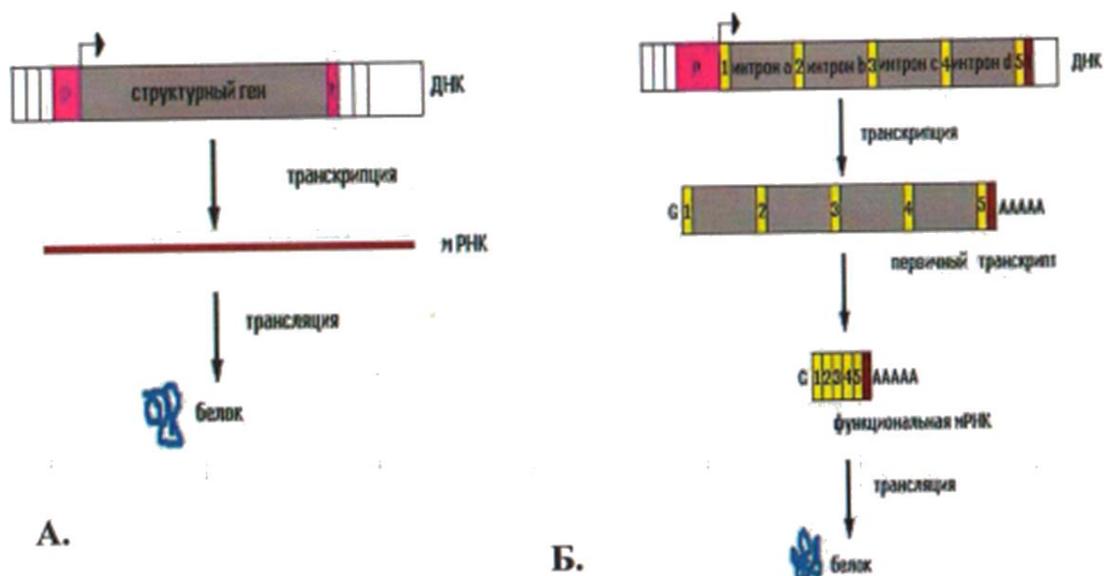


Рис. 1.3. Схематическое изображение структурных генов прокариот (А) и эукариот (Б). Обозначения: р-промотор; t-область терминации транскрипции; G-"кэп"-структура.

### Литература

1. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия М: Высшая школа 2002
2. Филиппович Ю. Б. Основы биохимии. М: Агар. 1999
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М: Мир. 2002
4. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М: Мир. 1998

## 2. Выделение ДНК

Процедура выделения ДНК является исходным пунктом в большинстве молекулярно-генетических исследований. Однако состав и структура клеток животных, растений и микроорганизмов настолько специфичны, что сложно говорить о существовании универсального метода выделения и очистки ДНК.

В данной главе описан ряд общих подходов к выделению ДНК из клеток различных типов. Кроме того, представлено несколько методик выделения и очистки ДНК, которые могут быть полезны в практической работе.

Прежде чем выбрать метод выделения ДНК, необходимо определить критерии для оценки возможности использования полученных препаратов для определенных целей. Такими критериями, прежде всего, являются: уровень загрязняющих веществ; время процедуры; количество ДНК в образце; молекулярная масса выделяемых фрагментов. В ряде случаев также важно предусмотреть материальные затраты, необходимые для реализации выбранного метода, и его воспроизводимость.

### 2.1 Этапы выделения ДНК

Обычно процедура выделения ДНК состоит из следующих этапов: **лизис** клеток, **очистка** от примесей и **преципитация** (осаждение) ДНК.

При выборе методики лизиса следует учитывать особенности химической структуры клеток различных организмов. Например, клетки растений содержат многочисленные пигменты, танины, полисахариды и имеют жесткую клеточную стенку. В бактериальных клетках содержатся липополисахариды, которые затрудняют очистку, и могут стать причиной проблем в дальнейшем использовании ДНК. Фиброзные ткани, такие как сердечная и скелетные мышцы, химический состав жировых клеток отличен от состава клеток мышц. Что касается пищевых продуктов, то в них ДНК чаще всего сильно фрагментирована, а ее количество может быть совсем небольшим.

Во многом успех очистки ДНК зависит от качества приготовления стартового образца. Идеально иметь дело со свежим материалом, без некротических включений, которые могут выделять эндотоксины. Имеет значение и фаза роста клеток, из которых предполагается выделять ДНК. Так, для выделения плазмидной ДНК из бактериальных культур предпочтительна поздняя лог-фаза, когда особенно велико отношение ДНК/белок, а количество мертвых клеток незначительно. Если же необходимо выделить ДНК из старого образца, лучше масштабировать процедуру, чтобы скомпенсировать потери от деградации генетического материала.

Важным фактором является быстрая гомогенизация образца. Для этого стоит заранее подобрать механический способ разрушения и оптимальное количество исходного материала. Слишком высокая вязкость конечного препарата ДНК нежелательна, поэтому, если вы не знаете точно, какое количество материала является оптимальным, то лучше взять на 30-40% меньше теоретически предполагаемого.

Одной из важных проблем является деградация нуклеиновых кислот под действием эндогенных нуклеаз, которые разрушают генетический материал клетки сразу после ее лизиса. Поэтому образцы клеток и тканей должны быть лизированы, по возможности, быстро и максимально полно с использованием буфера, содержащего компоненты, инактивирующие эндонуклеазы. Значительно снижает нуклеазную активность проведение процедуры лизиса при низких температурах.

Кроме этого, следует всегда помнить, что:

-вся применяемая лабораторная посуда должна быть стерильной;

-для приготовления водных растворов должна быть использована бидистиллированная вода; -растворы (или стоки) должны быть, по возможности, автоклавированы и храниться при 4°C ограниченное время (условия хранения растворов подробно описаны в протоколе выделения ДНК, которым вы пользуетесь).

## Лизис

Для солюбилизации клеточной и ядерной (у эукариот) мембран используются детергенты. Лизирующее действие детергента на клеточную мембрану схематически изображено на **рисунке 1.2**. Наиболее популярными детергентами являются - SDS (додецилсульфат натрия), Triton X-100 и **СТАВ** (hexadecyltrimethyl ammonium bromide). СТАВ не только вызывает лизис клеток, но и в условиях низкой концентрации соли взаимодействует с ДНК, образуя нерастворимый комплекс. С помощью этого реагента, например, легко избавиться от полисахаридов и фенольных соединений, которыми избилует растительная клетка.

Часто в буфер для лизиса наряду с детергентом добавляют ферменты, действующие на компоненты клеточных мембран. Так, лизоцим взаимодействует с компонентом клеточной стенки грам-положительных бактерий - пептидогликаном. Протеиназа К разрушает гликополипротеиды и инактивирует до некоторой степени нуклеазы. Для повышения эффективности лизиса в ряде случаев применяют нагревание и добавление денатурирующих агентов, таких как мочевины или солей гуанидина.

Для гомогенизации сложных образцов используется обработка ультразвуком, растирание в жидком азоте или со стеклянными шариками, фильтрация на прессе. При этом необходимо тщательно подбирать режим разрушения и время добавления лизирующего буфера.

Большие молекулы геномной ДНК легко разрушаются под действием механических манипуляций до коротких фрагментов. Поэтому, если необходимо получить ДНК большого молекулярного веса, следует избегать встряхивания и длительного пипетирования, особенно через наконечники малого объема. Если нет возможности продолжить работу с лизированным образцом немедленно, следует хранить его при -70°C, нелизированные образцы можно поместить в жидкий азот или сухой лед.

## Очистка ДНК

### Высаливание

Многие методы отделения ДНК от клеточных компонентов базируются на применении соединений, повышающих или понижающих растворимость веществ в водных растворах. В качестве повышающего растворимость компонента при очистке ДНК применяют соли гуанидина, причем наиболее эффективен гуанидинизотиоцианат, поскольку его катионная и анионная части обладают этим свойством. Типичными соединениями, снижающими растворимость, являются сульфат или ацетат аммония и калия.

Эти соли применяются в первую очередь для высаливания белков. Таким образом, удаление загрязнений можно проводить селективно, высаливая их или ДНК из раствора. Добавление к растворам солей восстанавливающих агентов (меркаптоэтанола или дитиотрейтола) способствует защите ДНК от окислительного повреждения.

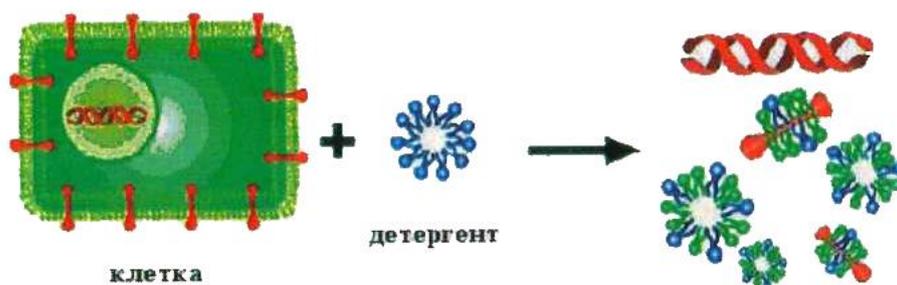


Рис.2.1 Действие детергента на клеточную мембрану.

Например, после лизиса с использованием детергент- и фермент- содержащего буфера (SDS+протеиназа K), к лизату добавляют ацетат калия, что приводит к высаливанию белков в комплексе с SDS и липидов. При этом ДНК и РНК остаются в растворе. Осадок удаляют центрифугированием, а оставшуюся в растворе ДНК подвергают дополнительной очистке и осаждают (подробно см. методы выделения ДНК).

### Экстракция органическими растворителями

Для освобождения от белков и липидов, оставшихся после осветления лизата, чаще всего используют фенол. Его можно добавлять непосредственно в буфер для лизиса, но более эффективно проводить экстракцию фенолом отдельно, добавляя его к образцу в SDS-буфере после лизиса. Сродство нуклеиновых кислот к образующейся двухфазной системе зависит от pH. Так, фенол с pH ниже 7,0 (кислый фенол) лучше растворяет низкомолекулярные ДНК (<50 kb), большие молекулы ДНК оказываются на границе фаз, а РНК остается в водной фазе. Поэтому кислый фенол используется в основном для очистки РНК. Фенол с pH 8,0 не растворяет ДНК, но экстрагирует из водной фазы белки и липиды. Фенол хорошо растворяется в хлороформе, поэтому, чтобы удалить его остатки из препарата ДНК, проводят дополнительную обработку хлороформом. Одновременно удаляются и О<sub>2</sub>.

Применение фенола позволяет получить довольно чистый препарат ДНК, однако в конечном препарате не должно присутствовать даже следов фенола. Схема очистки ДНК с помощью органических растворителей с последующей преципитацией представлена на рисунке 2.2 .

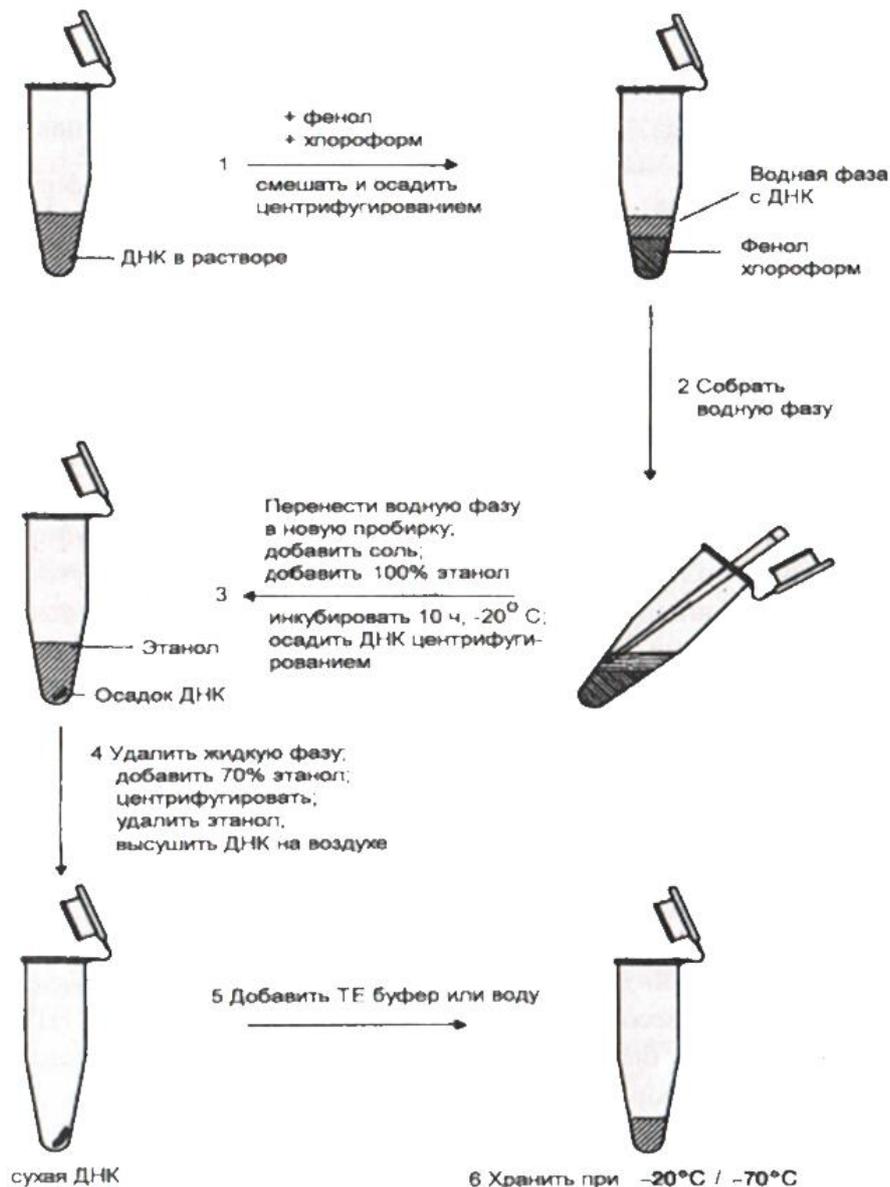


Рис. 2.2. Схема очистки ДНК с применением фенола и хлороформа. Хроматография

Такие методы, как гельфильтрация, ионообменная и гидрофобная хроматографии, селективная адсорбция также используются для очистки нуклеиновых кислот. При **гельфильтрации** разделение биополимерных молекул, включая нуклеиновые кислоты, обусловлено тем, что их молекулы в зависимости от размера по-разному диффундируют в пористые частицы геля.

**Ионообменная хроматография** основывается на электростатическом взаимодействии молекул с функциональными группами матрикса. Нуклеиновые кислоты - отрицательно заряженные линейные полианионы - элюируются с ионообменника буфером, содержащим соль. В денатурирующих условиях (в присутствии больших концентраций соли) нуклеиновые кислоты адсорбируются на поверхности стеклянных или кремниевых частиц за счет гидрофобного взаимодействия, тогда как для других биологических молекул это не характерно. Связанную таким образом ДНК отмывают этанолом, содержащим соль, чтобы не нарушить адсорбцию, и элюируют ДНК водой или TE буфером (10 мМ Трис, 1мМ ЭДТА).

## Преципитация ДНК

Обычно для преципитации ДНК используют этанол (75-80%) в присутствии солей. Для селективного осаждения ДНК с высоким молекулярным весом применяют полиэтиленгликоль (ПЭГ), однако он может быть помехой при дальнейшем использовании препарата. Трихлоруксусная кислота способна осаждать даже низкомолекулярные фрагменты, но в этом случае полученная ДНК не восстанавливается в функциональную форму.

Выбор соли для преципитации также является существенным, поскольку ее катионы противодействуют отталкиванию молекул, вызванному отрицательными зарядами фосфатного остова ДНК. Для преимущественной преципитации молекул с высоким молекулярным весом используется ацетат аммония, кроме того, он легко удаляется из препарата. Хлорид лития в основном применяют для селективного осаждения РНК, поскольку  $Li^+$  не осаждает 2-х цепочечную ДНК, белки или углеводы. Для эффективной преципитации ДНК необходима инкубация образца при низких температурах (предпочтительно - 20°C), как минимум 10 мин с последующим центрифугированием.

Температура и время инкубации особенно важны, когда содержание ДНК в препарате невелико. Если концентрация ДНК выше 0,25 мг/мл преципитация может проводиться и при комнатной температуре. После преципитации необходимо удалить остатки солей из осадка ДНК. Это достигается одно- или двукратной отмывкой осадка 70% этанолом. Затем осадок (если его достаточно много) сушится под вакуумом или в пробирке с открытой крышкой при комнатной температуре и растворяется в воде или ТЕ-буфере до конечной концентрации не более 1 мг/мл. Иногда для лучшего растворения ДНК применяют кратковременное мягкое нагревание.

Для получения ДНК с высокой молекулярной массой после преципитации отмывку спиртом заменяют на диализ препарата против ТЕ буфера в течение нескольких дней с периодической заменой ТЕ буфера на свежий. Это особенно важно, если ДНК планируется использовать для создания геномной библиотеки.

Для преципитации ДНК из препаратов с ее низким содержанием (<0,1 мкг/мл) успешно используется спермин (Sigma). Спермин (0,1 - 1 мМ) связывается с молекулой ДНК и конденсирует ее структуру в растворе, в результате чего формируется осадок даже в буферах с низкой концентрацией соли. Осадок ДНК отделяют центрифугированием, отмывают 70% этанолом, сушат и растворяют в воде или ТЕ буфере.

## 2.2 Факторы, влияющие на стабильность изолированной ДНК

Целостность очищенной ДНК в растворе зависит от многих факторов: наличия нуклеаз, тяжелых металлов, рН (ДНК разрушается при  $pH < 6,0$  и  $> 9,0$ ), воздействия ультрафиолета и свободных радикалов. Для защиты ДНК от повреждения ионами тяжелых металлов в раствор добавляют хелатирующий агент - натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), которая, кроме того, снижает активность нуклеаз за счет взаимодействия с их кофактором -  $Mg^{2+}$ . Использование Трис/НС1 для приготовления буферов обеспечивает оптимальный рН и противодействует образованию свободных радикалов.

Для долговременного сохранения ДНК большое значение имеет температура. До двух недель препараты ДНК могут храниться при 4°C, однако наиболее высокая стабильность ДНК достигается при хранении препарата при -70 / -80°C. Хранение при -20°C в течение длительного времени приводит к деградации ДНК.

Другой способ хранения генетического материала - замораживание высушенного ДНК-содержащего образца в нативном состоянии. ДНК в замороженной сухой ткани стабильна в течение 6 месяцев.

Остатки химических реагентов, применяемых при выделении и очистке, могут быть крайне нежелательны в дальнейшем использовании полученных препаратов ДНК. Так, гуанидинизоцианат, применяющийся для проведения лизиса клеток, даже в следовых количествах, ингибирует некоторые ферменты. Этанол, используемый для преципитации и отмывки ДНК, также должен быть полностью удален. Использование смеси фенола с хлороформом для экстракции клеточных компонентов также может повлиять на качество препарата ДНК. Если метод с фенолом оказывается в вашем случае неприемлемым, следует применять один хлороформ или его смесь с другим растворителем.

Ионы аммония могут ингибировать Т4 полинуклеотидкиназу, а ионы хлора влиять на реакции трансляции. Фосфатные буферы могут также ингибировать ряд ферментов: алкалинфосфатазу, Таq полимеразу. Антикоагулянт гепарин может загрязнять препараты ДНК, выделенные из крови, поэтому он должен быть удален, особенно, если выделенная ДНК будет использоваться в ПЦР.

## 2.3 Количественное определение ДНК в препаратах

### Спектрофотометрия

Содержание ДНК в полученных препаратах можно определить, измеряя их поглощение в ультрафиолетовой области спектра (260 нм). Этот метод достаточно прост и точен, если водные растворы ДНК не содержат примесей белков, фенола и т.п. Чистоту ДНК в препарате тоже можно оценить спектрофотометрически. Поглощение образца (А) измеряют при 260 нм, 280 нм и 230 нм против контроля - растворителя ДНК (вода или ТЕ буфер). Поскольку растворы белков поглощают при 280 нм, отношение  $A_{260}/A_{280}$  может быть показателем чистоты препарата. Для чистой ДНК это отношение должно быть примерно 1,8. Если соотношение меньше, точно определить содержание ДНК в препарате становится невозможным. Поглощение препарата при 230 нм свидетельствует о загрязнении углеводами, пептидами, фенолом. Если образец чистый, отношение  $A_{260}/A_{230} = 2,2$ . Если величины этих соотношений соответствуют указанным критериям, концентрацию ДНК можно определить, используя уравнение

$$A = eC,$$

где А - поглощение при 260 нм, С - концентрация нуклеиновой кислоты, а Е - коэффициент экстинкции при 260 нм, величина которого для разных типов нуклеиновых кислот несколько отличается. Так, поглощение чистыми препаратами в 1 см кювете при 260 нм, равное 1, соответствует концентрации 50 мкг/мл для двухцепочечной ДНК, приблизительно 37 мкг/мл - для одноцепочечной ДНК. Учитывая эти соотношения, концентрацию ДНК в препарате можно рассчитать по формулам:

$$\text{для одноцепочечной ДНК } C \text{ (мкг/мл)} = A_{260} / 0,027$$

$$\text{для двухцепочечной ДНК } C \text{ (мкг/мл)} = A_{260} / 0,02$$

Следует отметить, что спектрофотометрический метод обычно используется, когда предполагаемое количество ДНК в растворе не менее 20 мкг/мл. Концентрацию разбавленных растворов ДНК определяют при помощи электрофореза в агарозном геле.

### Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез препаратов ДНК проводят в 1% агарозном геле (раствор агарозы в 0,01M TBE буфере, pH 8,0), содержащем этидиумбромид (5 мкг/мл), который обеспечивает визуализацию ДНК в геле при освещении ультрафиолетом. Наряду с образцами ДНК, которые наносятся в карманы геля в специальном буфере для образцов (0,25% бромфеноловый синий, 30% глицерин, 10 mM Трис-НС1, 1 mM ЭДТА), в качестве калибровочного материала наносят ДНК с известной концентрацией (стандарты). Обычно для этих целей используют ДНК фага λ.

Количество ДНК оценивают при сравнении интенсивности флуоресценции образцов со стандартами в ультрафиолетовом свете.

### Флюориметрический метод

Метод основан на окрашивании ДНК в образце Hotscht dye 33257 реагентом с последующим измерением адсорбции на флюориметре и расчетом концентрации ДНК по калибровочному графику. Для создания калибровочного графика в качестве стандарта используется ДНК фага λ. Для приготовления стандартного раствора 20 мл ДНК фага λ с концентрацией 0,25 мг/мл доводят деионизированной дистиллированной водой до 200 мл. Этот раствор может храниться при -20°C. Окрашивающий реагент готовят растворением 10 мл Hotscht dye 33257 (1мг/мл) в 100 мл TNE буфера (10 мМ Трис, рН 8,0; 1 мМ ЭДТА, рН 8,0; 100 мМ NaCl). Конечная концентрация Hotscht dye в реагенте 100 нг/мл. Измерение проводят во флюориметре, помещая 2 мл окрашивающего реагента в кювету, при этом получаемую величину адсорбции фиксируют как нулевую. Далее кювету вынимают из флюориметра, добавляют ровно 1 мл стандартного раствора ДНК фага λ, перемешивают несколько раз, переворачивая кювету, и измеряют величину адсорбции. Повторяют эту процедуру, добавляя возрастающий объем в мл раствора ДНК фага λ к 2 мл реагента вплоть до 20 мл общего объема в кювете. Полученные величины измерений используют для построения калибровочного графика. Перед измерением образца кювету следует несколько раз промыть раствором реагента, каждый раз интенсивно встряхивая. В отмытую кювету опять наливают 2 мл реагента, добавляют 1 мл образца и измеряют величину адсорбции. Важно, чтобы эта величина оказалась в линейной области калибровочного графика, поэтому для измерения можно взять большее количество образца (в мл), или, если это необходимо разбавить его водой. Концентрацию ДНК в образце определяют по калибровочному графику и рассчитывают содержание ДНК в препарате, учитывая разбавление.

## 2.4 Методы выделения ДНК

В данном разделе приведены методы выделения ДНК, которые зарекомендовали себя, как наиболее надежные и хорошо воспроизводимые и могут быть использованы для выделения генетического материала из растений и пищевых продуктов.

### Выделение ДНК из растительного материала (микрометод со СТАВ)

Метод успешно применяется как для выделения растительной ДНК, так и для выделения ДНК из пищевых продуктов и позволяет эффективно удалять полисахариды и фенольные соединения, которые отрицательно влияют на качество конечного препарата ДНК.

#### Реактивы

1. СТАВ-буфер: 1,4 М NaCl, 0,1 М Трис HCl, 20 мМ ЭДТА, 20 г/л СТАВ, рН 8,0.
2. СТАВ-раствор для преципитации: 5 г/л СТАВ, 0,04 М NaCl.
3. 70% этанол.
4. РНКаза А - 10 мг/мл, хранить при -20°C.
5. Протеиназа К - 20 мг/мл, хранить при -20°C.

#### Методика

1. Гомогенизировать растительный материал, растирая его в пробирке тефлоновым пестиком.
2. Перенести 100 мг гомогенного образца в 1,5 мл пробирку.
3. Добавить 300 мкл стерильной воды, перемешать.

4. Добавить 500 мкл СТАВ-буфера, перемешать.
5. Добавить 20 мкл протеиназы К, встряхнуть и инкубировать при 65°C 30-90 мин.
6. Добавить 20 мкл РНКазы А, встряхнуть и инкубировать при 65°C 5-10 мин.
7. Центрифугировать 10 мин при 14000g.
8. Перенести супернатант в пробирку, содержащую 500 мкл хлороформа, встряхивать на vortex 30 сек, центрифугировать 10 мин при 14000 g.
9. Перенести 500 мкл водной фазы (верхний слой) в новую пробирку, содержащую 500 мкл хлороформа, встряхнуть.
10. Центрифугировать 5 мин при 14000 g.
11. Перенести верхний слой в новую пробирку.
12. Добавить 2 объема СТАВ-раствора для преципитации, перемешать пипетированием.
13. Инкубировать 60 мин при комнатной температуре.
14. Центрифугировать 5 мин при 14000g.
15. Удалить супернатант (ДНК в осадке).
16. Растворить осадок в 350 мкл NaCl (1,2 M).
17. Добавить 350 мкл хлороформа, встряхивать на vortex 30 сек.
18. Центрифугировать 10 мин при 14000g до разделения фаз.
19. Перенести верхний слой в новую пробирку.
20. Добавить 0,6 объема изопропанола, встряхнуть.
21. Центрифугировать 10 мин при 14000g.
22. Удалить супернатант пипеткой.
23. Добавить 500 мкл 70% этанола, осторожно встряхнуть.
24. Центрифугировать 10 мин при 14000g.
25. Удалить супернатант, осторожно слив его из пробирки.
26. Высушить осадок ДНК, оставив пробирку с открытой крышкой при комнатной температуре.
27. Растворить ДНК в 100 мкл воды или TE буфера.

### **Экспресс-метод выделения ДНК из растительной ткани**

(метод разработан в центре «Биоинженерия» РАН)

Этот метод отличается простотой и меньшими временными и материальными затратами по сравнению с приведенным выше. Если в качестве тестируемых образцов предполагаются семена или клубни растений, их рекомендуется прорастить в контролируемых условиях.

#### **Реактивы**

1. Лизирующий буфер: 200 мМ Трис HCl, pH 7,5, 250 мМ NaCl, 25 мМ ЭДТА, 0,5% SDS.
2. Ацетат калия: 5 М раствор.
3. 70 и 96% этанол.

#### **Методика**

1. 10-14 мг растительной ткани помещают в пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, интенсивно гомогенизируют в 400 мкл лизирующего буфера с помощью тefлонового пестика.
2. Пробирки с гомогенатом встряхивать 5 сек на vortex.
3. Поместить пробирки в термостат и инкубировать при 65°C 15 мин, периодически перемешивая содержимое пробирки мягким покачиванием.
4. Добавить в пробирки по 200 мкл 5 М ацетата калия (предварительно охлажденного в холодильнике) и тщательно перемешать содержимое пробирок легким встряхиванием.

5. Инкубировать пробы на ледяной бане 15 мин.
6. Центрифугировать при 14000g 20 мин при комнатной температуре.
7. Осторожно отобрать 400 мкл супернатанта в чистые пробирки и осадить двумя объемами 96% этанола (охлажденного), осторожно перемешивая. (На этом этапе можно наблюдать образование маленькой «медузы» или мелко дисперсной взвеси).
8. Оставить пробирки на столе на 5 мин.
9. Центрифугировать пробы 14000g 10 мин при комнатной температуре.
10. Осадок ДНК промыть охлажденным при -20°C 70% этанолом.
11. Центрифугировать 14000g 10 мин при комнатной температуре (рекомендуется повторить эту процедуру еще раз).
12. Слить надосадочную жидкость и с помощью микропипетки максимально удалить остатки жидкости из пробирки.
13. Осадок ДНК подсушить при комнатной температуре, открыв крышки пробирок.
14. Растворить ДНК в 100 мкл стерильной воды или TE- буфера.

## Выделение ДНК из продуктов питания

(метод разработан в центре «Биоинженерия» РАН)

### Реактивы

1. Буфер А: 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM /3 -меркаптоэтанола).
2. SDS: 20% раствор.
3. Ацетат калия: 5 M раствор.
4. Смола Wizard MaxiPreps (Promega,США).
5. Изопропанол: 80% раствор.

### Методика

1. 0,5 г образца пищевого продукта гомогенизировать при помощи стеклянного или тefлонового пестика в 0,5 мл буфера А.
2. Добавить 100 мкл 20% SDS. Смесь тщательно перемешать и инкубировать 20-30 мин при 65°C.
3. Охладить до 4°C, добавить 0,3 мл 5 M ацетата калия, встряхнуть на vortex и центрифугировать 10 мин при 14000g при комнатной температуре.
4. Собрать надосадочную жидкость и добавить к ней 1 мл смолы Wizard MaxiPreps (Promega,США) и инкубировать смесь 10 мин при 25°C.
5. Прокачать полученную смесь сквозь мини-колонку Wizard (Promega, США), промыть 2 мл 80-процентного изопропанола, отжать оставшийся в мини-колонке изопропанол центрифугированием на микроцентрифуге (14000g, 2 мин).
6. Добавить в микроколонку 50 мкл дистиллированной воды, подогретой до 65°C.
7. Инкубировать мини-колонку с водой 10 мин. при 65°C, и отжать раствор ДНК в чистую микроцентрифужную пробирку центрифугированием (14000g, 2 мин.).

### Примечание

Образцы пищевых продуктов с повышенным содержанием маслянистых веществ перед выделением ДНК требуется подвергнуть дополнительной экстракции эмульсией хлороформа в воде. Для этого 0,5 г исследуемого продукта гомогенизируют в смеси 0,5 мл буфера А и 0,5 мл хлороформа и инкубируют гомогенат 20 мин при 56 °С. Затем охлаждают его до 4°C и центрифугируют 10 мин при 14000g при комнатной температуре. Водную фазу собирают и переносят в чистую пробирку. Далее продолжают, начиная с пункта 2 вышеизложенной методики.

## Литература

1. Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
2. Ausubel M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., and Struhl K. (1998) *Current protocols in Molecular Biology*. Wiley, NY.
3. Johnson S.R., Martin D.H., Cammarata C., and Morse S.A. (1995) Alterations in sample preparation increase sensitivity of PCR assay for diagnosis of chancroid. *J.Clin Microbiol.* 33:1036-1038.
4. Grimberg J., Nawooschik S., Beliscio L., McKee K., Turck A., and Eisenberg A. (1989) A simple and efficient non organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucl. Acids Res.* 17:83-90.
5. Takahashi R., Matsuo S., Pkuyama T., and Sugiyama T. (1995) Degradation of macromolecules during preservation of lyophilized pathological tissues. *Pathol. Res. Pract.* 191:420-426.
6. Harrison P.R. (1971) Selective precipitation of ribonucleic acid from a mixture of total cellular nucleic acids extracted from cultured mammalian cells. *Biochem. J.* 121:27-31.
7. Hoopes B. C., and McClure W. R. (1981) The use of spermine in DNA purification. *Nucleic Acids Res.* 9:5493.
8. Birnboim H.C., and Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl.Acids Res.* 7:1513-1523.
9. Pham T.T., Chilapagari S., and Suarez A.R. (1996) Preparation of pure plasmid or cosmid DNA using single-strand affinity matrix and gel-filtration spin columns. *Biotech.* 20:492-497.
10. Kondo T., Mukai M., and Kondo Y. (1991) Rapid isolation of DNA by LiCl-ethidium bromide treatment and gel-filtration. *Anal. Biochem.* 198: 30-35.
11. Murray M.G., Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4325.
12. Smith D.S, Maxwell P.W, De Boer S.H. (2005) Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato- derived products. *JAgric Food Chem.* 53(26): 9848-59.

### 3. Полимеразная цепная реакция

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** - это метод амплификации *in vitro*, с помощью которого можно размножить определенную последовательность ДНК в миллионы раз. ПЦР была разработана американским ученым **Кэри Мюллисом в 1983 г.**, а в 1993 г. за ее открытие К. Мюллис был удостоен Нобелевской премии в области химии. Изящность и простота исполнения, высокая чувствительность, специфичность и скорость получения результатов обеспечили широкое распространение ПЦР в научных лабораториях и в практической сфере. В настоящее время ПЦР успешно используется при клонировании геномных последовательностей, прямом секвенировании ДНК, направленном введении мутаций, генотипировании, диагностике рецессивных наследственных заболеваний, выявлении вирусных и бактериальных патогенов, а также для исследования ископаемых остатков живых существ и в судебной практике для проведения «молекулярной дактилоскопии».

#### 3.1 Принцип полимеразной цепной реакции

В основе ПЦР лежит способность ДНК-полимераз осуществлять точный матричный синтез ДНК по принципу комплементарности. Принцип ПЦР представлен на рис.3.1-3.2.

В реакции используют два олигонуклеотидных **праймера** (затравки для работы ДНК-полимеразы), фланкирующие интересующий участок ДНК, и комплементарные противоположным цепям ДНК. Процесс амплификации состоит из повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига олигонуклеотидов с комплементарными последовательностями ДНК (образование коротких двухцепочечных участков ДНК, необходимых для инициации синтеза ДНК) и последующей достройки полинуклеотидных цепей **ДНК-полимеразой**. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез протекает только между ними. Поскольку матрицами для копирования в каждом цикле реакции являются как фрагменты, синтезированные на предыдущем цикле, так и матрицы, с которых они были копированы, в результате происходит экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента.



Рис.3.1. Исходные компоненты ПЦР

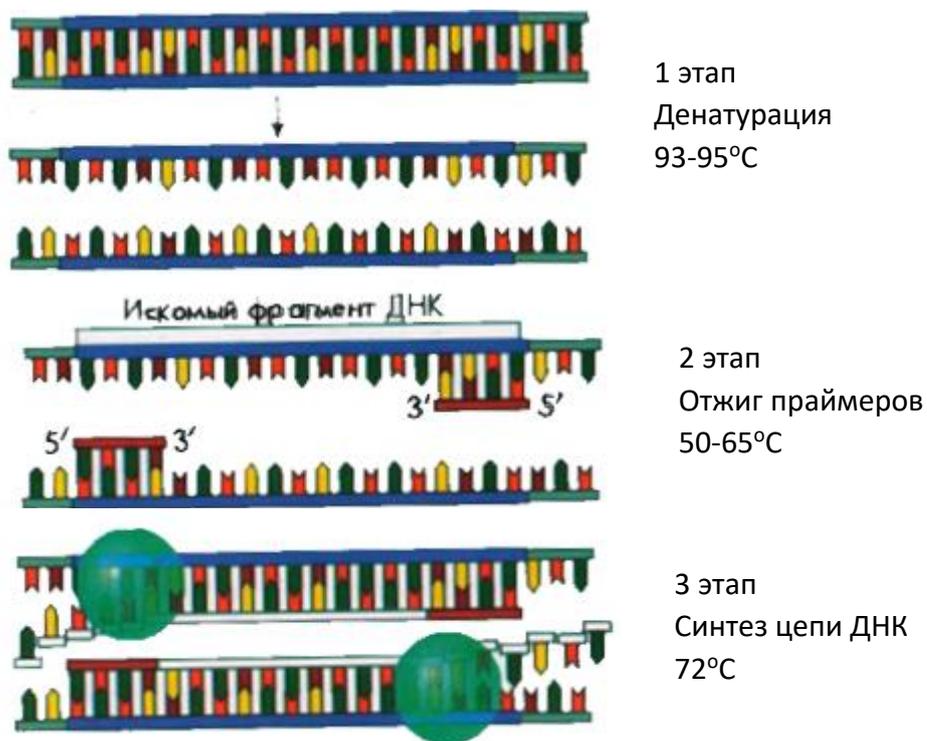


Рис.3.2. Схема полимеразной цепной реакции. 1-й цикл амплификации

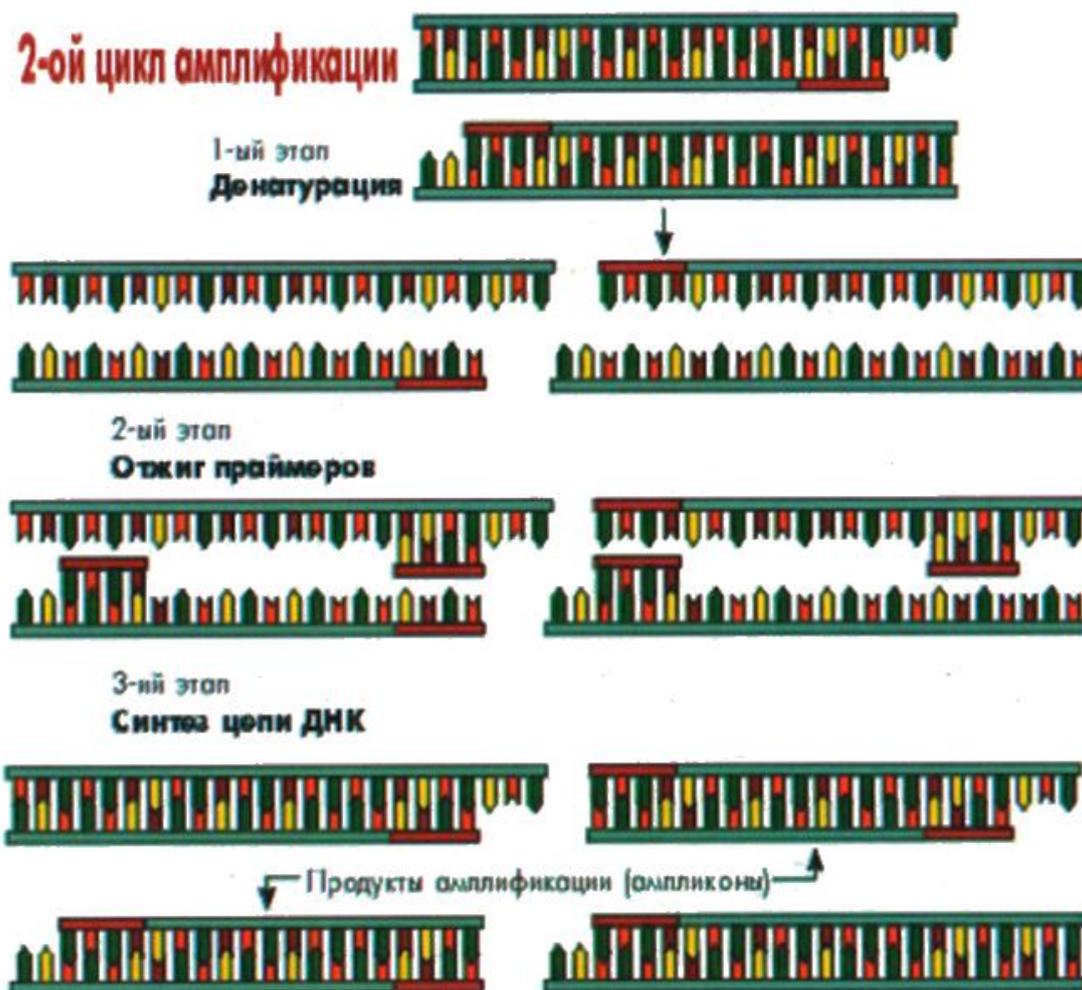


Рис.3.3. Схема полимеразной цепной реакции. 2-й цикл амплификации

### 3.2 Программируемые термостаты

Аmplификация проводится в специальном программируемом термостате (**амплификаторе**). Реакция проходит в едином блоке, в котором по заданной программе происходит быстрая смена температур. Смена температур осуществляется с использованием элементов Пельте, а цикличность процесса - при помощи программного управления. Подавляющее большинство современных приборов снабжено специальными термостатируемыми крышками, плотно прилегающими к пробиркам, в которых протекает реакция.

В этих крышках постоянно поддерживается высокая температура (обычно 105°C), что предотвращает испарение находящейся в пробирках реакционной смеси. При отсутствии в приборах такой крышки на поверхность реакционной смеси наслаивают минеральное масло.

В настоящее время созданы приборы, в которых отжиг праймеров в ПЦР может происходить одновременно при разных температурах. Это так называемые градиентные ПЦР-амплификаторы.

Разработки последнего времени позволили создать приборы, позволяющие отслеживать и проводить количественное измерение фрагментов ДНК, синтезируемых в ПЦР по ходу процесса, цикл за циклом, причем проводить такие измерения в высоковоспроизводимой экспоненциальной фазе ПЦР. Такие приборы получили название **“ПЦР-амплификаторов реального времени” (Real time PCR)**. Они снабжены специальными высокочувствительными приставками (оптическими модулями), позволяющими регистрировать флуоресценцию в пробирках с реакционной смесью.

В этом случае при проведении ПЦР используются флуоресцентные красители, вводимые в состав олигонуклеотидов, или красители, избирательно связывающиеся с двухцепочечной ДНК. В качестве интеркалирующего красителя наиболее часто используют “SYBR Green”. В технологиях “TaqMan”, “Molecular Beacons” и “LightCycler” используют меченные флуоресцентными метками олигонуклеотидные пробы.

Все современные приборы позволяют проводить ПЦР в разных форматах, а именно, в одиночных пробирках (0,2 или 0,5-мл), в пробирках, соединенных по 8, 96 или 384 штук, а также в различных планшетах.

### 3.3 Компоненты реакционной смеси

Реакционная смесь (25-100 мкл) содержит: термостабильную ДНК-полимеразу, смесь четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, два специфических праймера, буфер для ДНК-полимеразы и исследуемый образец.

#### ДНК-полимеразы

В ПЦР используются ДНК-полимеразы, выделенные из термофильных бактерий. В отличие от термочувствительного фрагмента Кленова ДНК-полимеразы *E. coli*, использовавшегося ранее, указанные полимеразы сохраняют свою активность после тепловой денатурации ДНК. Поэтому нет необходимости в замене фермента после каждого цикла. Еще одно достоинство таких полимераз заключается в более высоком температурном оптимуме их работы (70-80°C). К наиболее широко используемым термостабильным ДНК-полимеразам относятся: ДНК-полимераза из *Thermus aquaticus* (**Taq-полимераза**), P/w-полимераза из *Pyrococcus furiosus*, Pwo-полимераза из *Pyrococcus woesei*, VentR-полимераза из *Thermococcus litoralis* и 77/г-полимераза из *Thermus thermophilis*. ДНК-полимеразы катализируют удлинение цепей праймеров, последовательно наращивая по одному нуклеотиду к 3'-ОН-концу. Таким образом, синтез новой цепи осуществляется в направлении 5'-3'. В реакции обычно

используют фермент в концентрации 2-5 ед. в 100 мкл реакционной смеси при синтезе фрагментов ДНК длиной до 3 т.п.н. За единицу активности принято считать количество фермента, катализирующего включение 10 нМ всех четырёх дезоксинуклеозидтрифосфатов (**dNTP**) в кислото-нерастворимую фракцию ДНК за 30 минут при 72°C.

Увеличение количества фермента может приводить к синтезу неспецифических фрагментов и к уменьшению выхода желаемого продукта. При необходимости синтеза более протяженных участков (например, для клонирования) рекомендуется использовать смесь *Taq*- и *Pfu*-ДНК-полимераз в соотношении 10:1. В этом случае можно достигнуть амплификации фрагментов длиной от 10 т.п.н. до 40 т.п.н.

## Олигонуклеотидные праймеры. Принципы подбора

**Праймеры** - синтетические олигонуклеотиды, комплементарные участкам матричной ДНК, между которыми находится последовательность-мишень. Синтез олигонуклеотидов осуществляется с помощью автоматических синтезаторов. Праймеры, используемые в ПЦР, обычно имеют длину от 17 до 30 нуклеотидных остатков. Если предполагается дальнейшее клонирование фрагмента, то в состав 5'-конца праймера можно включить последовательность, не комплементарную исследуемому образцу, например, сайты рестрикции или регуляторные элементы. Наиболее критическими параметрами при подборе праймеров являются следующие:

1. температура плавления (Тпл);
2. специфичность;
3. комплементарность последовательностей праймеров;
4. содержание GC, протяженных полипуриновых и полипиримидиновых последовательностей;
5. последовательность на 3'-конце праймера.

Обычно, при проведении ПЦР температуру отжига праймеров задают на 1-5°C ниже значения температуры плавления более "легкоплавкого" олигонуклеотида. Поэтому желательно, чтобы Тпл обоих олигонуклеотидов была приблизительно равной. Если праймеры будут сильно отличаться по Тпл, тогда праймер с более высокой Тпл будет отжигаться с неспецифическими участками ДНК. Это приведет либо к появлению неспецифических продуктов реакции, либо к понижению выхода продукта (в зависимости от расстояний между отоженными праймерами).

Температура плавления праймера достаточно точно рассчитывается по формуле:

$$T_{пл} \text{ праймера} = \Delta H [\Delta S + R \ln (c/4)] - 273,15 + 16,6 \log_{10} [K^+],$$

где  $\Delta H$  - энтальпия.  $\Delta S$  - энтропия образования шпильки,  $R$  - молярная газовая константа,  $c$  - концентрация праймера.

Данный алгоритм использован во многих компьютерных программах, с помощью которых обычно рассчитывают температуры плавления праймеров. Наиболее популярной из них является программа "Oligo". В настоящее время доступна шестая версия этой программы. Следует отметить, что в программное обеспечение современных приборов включены программы по расчету температур плавления праймеров.

Длина олигонуклеотида является существенным параметром, определяющим специфичность реакции. Очевидно, что вероятность встречаемости в ДНК последовательностей, идентичных праймеру, убывает с возрастанием длины праймера. Однако, в случае использования очень длинных праймеров, существует опасность неспецифического отжига их 3'-концевых последовательностей. Желательно, при подборе праймеров проверять, является ли последовательность праймера уникальной в ДНК-матрице.

Общее требование к праймерам - отсутствие **комплементарное™** как между двумя используемыми в реакции праймерами, так и самокомплементарности одного из праймеров.

В противном случае олигонуклеотиды будут склонны ассоциировать с образованием димеров или частично двухцепочечных участков. Очевидно, что в таких случаях будет наблюдаться неэффективное использование праймеров в ПЦР.

Необходимо выбирать праймеры с содержанием GC около 50% и случайным распределением оснований. Следует избегать использования праймеров с протяженными полипуриновыми (A, G) и полипиримидиновыми (T, C) участками. Наличие поли G или поли C последовательностей способствует неспецифическому отжигу, присутствие поли A и поли T - снижению эффективности амплификации за счет ослабления комплекса праймер-матрица. Желательно, чтобы праймер заканчивался остатком G, C, или дуплетом GC на 3'-конце. Это способствует более прочному связыванию праймера. Последние три нуклеотида 3'-конца праймера должны быть строго комплементарны матричной ДНК.

## Буфер

Буфер для ПЦР с использованием Тад-полимеразы обычно содержит 50 мМ KCl, ЮмМ Трис-HCl pH 8,4, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> и 100 мкг/мл желатины. Ионы Mg<sup>2+</sup> необходимы для поддержания активности фермента. Ионы Mg<sup>2+</sup> связываются с dNTP с образованием комплексов, являющихся субстратом для Тад-полимеразы. Концентрация MgCl<sub>2</sub> в буфере может варьировать от 1 мМ до 5 мМ (подбирается эмпирически). Оптимум концентрации Mg<sup>2+</sup> зависит от последовательностей матрицы и праймеров. Увеличение концентрации Mg<sup>2+</sup>, при других равных условиях, оказывает резкое влияние на специфичность и эффективность ПЦР: увеличивается выход, но более высокими темпами уменьшается специфичность. Повышение концентрации Mg<sup>2+</sup> вызывает повышение температуры плавления ДНК. При использовании других термостабильных ДНК-полимераз необходимо учитывать тот факт, что буферные системы для них могут отличаться значением pH, концентрацией соли, использованием MgSO<sub>4</sub> вместо MgCl<sub>2</sub> и др.

Для работы также необходима смесь всех трифосфатов, каждый в концентрации 2 мМ. Диапазон используемых концентраций в реакции - 50-500 мкМ. Несбалансированность в концентрациях dNTP может приводить к ошибочному включению нуклеотидов в ходе синтеза ДНК.

## Матрица

Матрицами для ПЦР-амплификации являются как двухцепочечные, так и одноцепочечные молекулы ДНК. Кроме того, в качестве матрицы может быть использована и РНК. Обычно, вначале путем обратной транскрипции получают **кДНК**, которую и используют в дальнейшем в ПЦР. Однако иногда реакцию проводят без предварительной стадии получения кДНК, используя Tth-полимеразу, обладающую ревертазной активностью в присутствии ионов Mn<sup>2+</sup> вместо ионов Mg<sup>2+</sup>

Так как ПЦР является высокочувствительным методом, в качестве источника генетического материала в реакции можно использовать образцы почв, воду, смывы с поверхностей, срезы кожи, кровь, сыворотку, мазки, биопсийный материал и т.д. всегда предшествует ПЦР. Методики выделения и очистки нуклеиновых кислот сильно варьируют в зависимости от источника (подробно см. главу «Выделение ДНК»).

Следует учитывать, что в конечных препаратах ДНК могут присутствовать примеси, ингибирующие протекание ПЦР.

## 3.4 Вещества, стимулирующие ПЦР, и ее ингибиторы

Иногда в реакционную смесь дополнительно вводятся вещества, которые улучшают специфичность и увеличивают выход продукта. К ним относятся ацетамид, бетаин Na, бычий

сывороточный альбумин, диметилсульфоксид, глицерин, хлорид тетраметиламмония, неионные детергенты - нонидет Р-40, твин 20, тритон Х-100 (таблица 1). Следует отметить, что некоторые органические и неорганические соединения могут ингибировать ПЦР, например, изопропанол, фенол, РНК, NaCl, ЭДТА, диэтилпиракарбонат, додецилсульфат Na и другие ионные детергенты, гепарин а также присутствующие в образцах полисахариды, гемоглобин, гуминовые кислоты.

Таблица 2.

Список веществ, используемых для оптимизации ПЦР

Вещество	Концентрация исходная	Концентрация в реакционной смеси	Механизм действия
БСА	10 мкг/мкл	~0,1 мкг/мл	стабилизация фермента
Глицерин	100%	5-10%	стабилизация фермента
Нонидет Р-40, Твин 20, Тритон Х-100	10%	0,1-0,5%	стабилизация фермента, предотвращает образование шпилечных структур
Бетаин Na	5 М	0,5-2 М	стабилизация фермента, понижение T <sub>пл</sub> ДНК
Ацетамид	25%	5%	повышение растворимости
ДМСО	100%	2,0-10%	повышение растворимости

### 3.5 Амплификация и контроль за прохождением ПЦР

Методика анализа с использованием ПЦР включает: 1) выделение ДНК (РНК) из биологического образца; 2) амплификацию специфических фрагментов ДНК; 3) детекцию продуктов амплификации.

#### Параметры циклов ПЦР

Как уже упоминалось, в стандартной ПЦР выделяют три этапа: **денатурацию** (образование одноцепочечной ДНК) матрицы, **отжиг** праймеров на одноцепочечной ДНК и **элонгацию** праймера ДНК-полимеразой. Количество циклов обычно составляет 25-35. Увеличение числа циклов может приводить к отрицательным последствиям, а именно, синтезу более длинных продуктов (образуются в результате использования в качестве праймера готового продукта), истощению исходных праймеров и дезоксинуклеозидтрифосфатов, а также частичной инактивацией фермента.

В ряде случаев указанным основным циклам предшествует дополнительный этап, заключающийся в предварительной денатурации образцов при 93°C -95°C в течение 3-10 минут. Этот этап необходим для полной диссоциации двухцепочечной ДНК в одноцепочечную. При использовании одноцепочечных матриц этим этапом можно пренебречь.

Денатурацию матриц на основных 25-35 циклах проводят при 94°C-95°C в течение 20-30 секунд. Температура и время денатурации выбираются как компромисс между необходимостью полностью денатурировать ДНК и опасностью сильно инактивировать ДНК-

полимеразу. Для Год-полимеразы, наиболее часто используемой при амплификации, оно равняется 120 мин при 92,5°C, 40 мин при 95,0°C и 6 мин при 97,5°C (в присутствии 10% глицерина увеличивается до 23 мин).

Отжиг праймеров проводят в течение 15-20 секунд при температуре равной либо ниже на 1-5°C температуры плавления праймеров. Оптимальным является интервал 50°C - 65°C.

Элонгацию проводят при 72°C - 75°C в течение времени, необходимого для синтеза участка ожидаемой длины. Время рассчитывают, исходя из скорости синтеза используемой ДНК- полимеразы. Следует учитывать, что если матрицами в ПЦР служат последовательности с высоким содержанием АТ, температуру элонгации снижают. Для Taq-полимеразы скорость синтеза составляет 150 нукл./сек при 75-80°C, 60 нукл./сек при 70°C, 24 нукл./сек при 55°C.

После завершения основных циклов иногда вводится дополнительная инкубация образцов при 72°C в течение 3-7 минут, необходимая для завершения достройки всех фрагментов ДНК в реакции.

### Анализ продуктов амплификации

Для оценки качества и приблизительного количества продуктов реакции аликвоты реакционной смеси (1-5 мкл) анализируют электрофорезом в агарозном геле в присутствии этидиума бромиды или других красителей, избирательно связывающихся с двухцепочечной и одноцепочечной ДНК. В случае коротких фрагментов ДНК (менее 300 п.н.) электрофорез проводят в

полиакриламидных гелях. Для оценки длины синтезируемых фрагментов при электрофорезе используют маркеры ДНК с известной длиной. Другой способ анализа - это гибридизация продуктов амплификации со специфическим зондом. Регистрация таких комплексов может быть проведена колориметрически или флуориметрически.

Результат ПЦР можно квалифицировать как положительный или отрицательный в зависимости от того, обнаружена в образце интересующая нас последовательность ДНК или нет. Однако нарушение нормального хода амплификации и непредвиденный полиморфизм последовательности-мишени в области связывания праймеров или гибридизационного зонда может дать ложноотрицательный результат. В случае загрязнения образцов и случайной гомологии между зондом, праймерами и последовательностью, сходной с мишенью, получаются ложноположительные результаты. Поэтому для правильной интерпретации результатов важным является постановка как положительных, так и отрицательных контролей.

### Ассиметричная ПЦР

Ассиметричную ПЦР (А-ПЦР) применяют для синтеза **одноцепочечной ДНК**, которую затем можно использовать в качестве зонда в экспериментах по гибридизации. В целом, постановка А-ПЦР схожа со стандартной ПЦР. Принципиальное отличие заключается в использовании в реакции неэквивалентных количеств двух праймеров для амплификации. В результате на первых 10-15 циклах будут синтезироваться двухцепочечные фрагменты ДНК, а при последующих 15 циклах при лимите одного из праймеров - одноцепочечная ДНК. Соотношение праймеров в реакции обычно составляет 1:50 или 1:100. Для получения ДНК-зонда один из праймеров метят биотином или флуоресцентным красителем. Мечение можно проводить и в ходе ПЦР, используя модифицированные (например, содержащие флуоресцентную метку) дезоксирибонуклеозидтрифосфаты.

## Литература

1. Bartlett J. M. S., Stirling D. 2003. PCR Protocols. Second edition. Humana Press Inc., New Jersey.
2. Dieffenbach C. W., Lowe T. M. J., Dveksler G. S. 1995. General concepts for PCR primer design. In: PCR primer. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 133-155.
3. Hengen P. N. (1995) Methods and reagents - fidelity of DNA polymerases for PCR. *Trends in Biochemical Sciences*. V. 20, p. 324-325.
4. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. 1995. PCR strategies. Academic Press, San Diego.
5. Tillib S., Strizhkov B., Mirzabekov A. (2001) Integration of multiple PCR amplification and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip. *Analyt. Biochem.* V. 292, p. 155-160.
6. Wilson I. G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 63, p. 3741-3751.

<http://www.molbiol.ru>

<http://www.pcr.ru>

<http://www.gene-quantification.info>

<http://www.pcrlinks.com>

<http://www.primer.ru/manuals/dna-tech/intro.htm>

## 4. Технология генных чипов

**Микроэрей (microarreys)** представляют собой упорядоченные наборы детектирующих элементов, закрепленных на твердой подложке. **Генные чипы** - это один из подвидов микроэреев, элементами которого являются микроскопические пятна ДНК. Каждое пятно содержит ДНК определенного вида, соответствующую гену или участку гена, который является предметом анализа.

Использование генных чипов основано на явлении **гибридизации**. Для гибридизации используют меченые пулы мРНК, выделенные из различных источников (культур клеток, тканей модельных организмов, образцы биопсии и т.д.), а также продукты ПЦР реакции. В процессе гибридизации молекулы нуклеиновых кислот формируют устойчивые двухцепочечные структуры благодаря связям между элементами молекул - нуклеотидами. Нуклеотид аденин (А) комплементарен тимину (Т), гуанин (G) - цитозину (С). В результате одноцепочечная последовательность нуклеотидов АТGC будет образовывать стабильную ассоциацию, двухцепочечную структуру, с одноцепочечной молекулой ДНК состава ТАСG:

АТGC....

||| |

ТАСG....

Подобная комплементарность приводит к «слипанию» двух молекул ДНК, одна из которых закреплена на подложке и является элементом ДНК-чипа. Чем больше содержится в образце молекул комплементарных элементов чипа, тем больше их будет связываться с чипом, и тем выше будет интенсивность сигнала, воспринимаемого от данного элемента.

### 4.1 Типы микроэреев

#### Генные чипы

На сегодняшний день наиболее распространенными являются так называемые *генные чипы низкой плотности*, содержащие на своей поверхности до 50000 пятен ДНК. В дальнейшем основные приемы конструирования и создания генных чипов будут рассмотрены на примере чипов именно этого типа, применяющихся для исследования дифференциальной экспрессии геном различных организмов.

Для простоты изложения мы будем использовать следующие термины: элементы генного чипа (**зонды**), меченые молекулы образца (**молекулы-мишени**).

Существуют два варианта ДНК чипов низкой плотности.

В первом из них на подложке закреплены двухцепочечные последовательности ДНК, в другом варианте – короткие одноцепочечные молекулы, иначе называемые **олигонуклеотидами**. Процедура гибридизации для обоих типов чипов примерно одинакова. На чип наносится меченый образец, гибридизуется, избыток образца смывается. Последующее сканирование поверхности чипа выявляет окрашенные участки поверхности. Окрашивание демонстрирует, что в этих участках успешно прошла гибридизация последовательностей ДНК, закрепленных на поверхности (зондов), и молекул ДНК образца, комплементарных им (мишень).

Фундаментальное отличие описанных систем лежит в размере закрепляемой на подложке молекулы ДНК. В первом варианте ДНК мишень получают путем ПЦР амплификации клонов из **библиотек кДНК** (подробнее см. далее). Размер таких фрагментов составляет 100 и более нуклеотидных пар. Фрагменты иммобилизуются на твердом основании микроэрея, мембране или стекле при помощи высокоскоростных печатающих роботизированных устройств. На поверхность одного чипа таким образом можно нанести до 50000 пятен ДНК.

Чипы данного типа относительно дешевы, их просто изготавливать и возможно адаптировать к нуждам конкретного проекта. К недостаткам этого типа ДНК-чипов можно отнести их малую избирательность. Использование длинных молекул ДНК несет с собой высокую вероятность перекрестной гибридизации между родственными генами и, как следствие, снижает чувствительность и селективность метода в целом.

В случае олигонуклеотидных ДНК-чипов последовательности 14-70 нуклеотидов, зондов, первоначально разрабатываются с использованием компьютерных алгоритмов, снижающих вероятность неспецифической - перекрестной гибридизации. Зонды заданной структуры затем синтезируют химическим путем и иммобилизуют на подложке.

Чипы на основе олигонуклеотидов отличаются высокой избирательностью, однако основным фактором, ограничивающим их применение, до сегодняшнего дня остается высокая цена химического синтеза ДНК. Тем не менее, снижение стоимости химического синтеза олигонуклеотидов в ближайшем будущем может обусловить рост популярности этого вида ДНК чипов.

Схема, описывающая изготовление генных чипов на основе библиотек кДНК и подготовку образца к процедуре гибридизации, изображена на **рисунке 4.1** (в конце главы).

Существуют также *генные чипы высокой плотности* (50000 пятен ДНК и выше). Примером этого вида чипов являются изделия известной компании «Аффиметрикс». Эти чипы могут содержать на своей поверхности более 300.000 пятен ДНК соответствующих десяткам тысяч различных генов. Высокая плотность размещения зондов стала возможной благодаря отказу от применения механических печатающих устройств. По технологии компании «Аффиметрикс» ДНК зонда синтезируется непосредственно на поверхности чипа. При этом длина одноцепочечного олигонуклеотида составляет 14-24 азотистых основания.

Генные чипы высокой плотности позволяют получить в одном эксперименте картину экспрессии всех генов, составляющих геном изучаемого организма. На сегодняшний день компанией «Аффиметрикс» предлагаются генные чипы, содержащие полные геномы 13-ти организмов, в том числе человека.

## Белковые чипы

Чипы, на поверхность которых нанесены белковые молекулы, предполагается использовать для измерения количества различных белков в образце, а также для изучения белок-белковых взаимодействий, т.е. обнаружения пар белков, образующих в клетках комплексы, необходимые для выполнения их биологических функций.

В настоящее время активно ведется тестирование белковых микроэрреев, несущих на своей поверхности антитела (антитела - это белки, способные специфически связываться с другими белками-антигенами строго определенной структуры, уникальной для каждого антитела). Антитело, закрепленное на поверхности чипа, связывает антиген, к которому, в свою очередь, прикрепляется антитело, несущее метку. Таким образом, становится возможным распознать наличие в образце антигенов заданной структуры. Преимуществом этого метода является возможность проводить идентификацию нескольких сотен антигенов, выполняя единичную аналитическую процедуру.

## Микроэрреи на основе цитологических образцов

Помимо белков и нуклеиновых кислот на поверхности чипа могут быть закреплены фрагменты цитологических препаратов. Образцы изымают из различных тканей и органов организма, находящегося в различных состояниях или на различных стадиях развития, например, нормы и патологии.

Ткани фиксируют для предотвращения деградации нуклеиновых кислот и нарезают на микроскопические диски - элементы чипа. Элементы закрепляют на твердой подложке.

Компания «Folio BioScience» производит чипы этого типа. Они содержат либо образцы семнадцати типов тканей человека, либо двадцати пяти типов тканей мыши. Проводя гибридизацию тканевого чипа с меченой ДНК исследуемых генов, можно сделать заключение об экспрессии данного гена в различных тканях организма. Метод является, по сути, попыткой масштабировать ранее известную методику *in situ* гибридизации. Использование чипов на основе цитологических образцов также позволяет максимально увеличить выход получаемой информации при проведении единичной экспериментальной процедуры.

## Микроэлектронные генные чипы

Применение новейших микроэлектронных технологий открывает широкие перспективы перед разработчиками генных чипов. Примером микроэлектронного генного чипа может служить изделие “eSensor™” компании «Clinical Micro Sensors», USA.

“eSensor™” - небольшой круглый чип, пронизанный 36-ю золотыми электродами. Каждый электрод подведен к пулу идентичных одноцепочечных молекул ДНК, соответствующих определенным фрагментам ДНК - улавливающим зондам. Когда молекула улавливающего зонда входит в соприкосновение с комплементарной молекулой мишенью, они образуют дуплекс.

Участок молекулы мишени, не спаренный с дуплексом, связывается с молекулой детектирующего зонда, предварительно добавленной в раствор. Эта молекула ковалентно связана с молекулами ферроцена, обладающими электропроводящими свойствами. Местоположение молекулы ферроцена относительно электрода изменяет электропроводные свойства электрода. Измеряя силу тока на электроде, можно оценить сколько и какой ДНК было обнаружено в образце.

Электронные генные чипы несомненно заслуживают внимания поскольку эта технология не только позволяет автоматизировать процесс анализа, но и создать генные чипы многоразового использования.

## 4.2 Создание микроэрреев на примере генных чипов низкой плотности

### Набор уникальных генов

Термин **набор уникальных генов (unigen set)** является ключевым понятием в дизайне микроэрреев. Под набором уникальных генов имеется в виду набор последовательностей ДНК, в котором каждый исследуемый ген, известный для данного организма, представлен в единственном экземпляре.

«Уникальность» важна для снижения затрат на производство чипа.

### Создание зондов на базе кДНК

Создание библиотеки кДНК является первым шагом на пути конструирования генного чипа. Для этого выделяют тотальную РНК изучаемого организма. В ней представлены, в разном количестве копий, все гены данного организма, экспрессируемые в условиях эксперимента. Из тотальной РНК выделяют мРНК, содержащую полиадениловые хвосты. мРНК подвергается процедуре **обратной транскрипции**. В ходе этой реакции на цепи мРНК при помощи фермента обратной транскриптазы строится вторая комплементарная ей цепь ДНК, называемая **кДНК**. мРНК-кДНК дуплекс затем обрабатывают ферментом РНКазой. мРНК разрушается и кДНК становится доступна для синтеза второй цепи ДНК.

Синтез второй цепи проводят с использованием фермента ДНК полимеразы *E.coli*.

Двухцепочечная кДНК готова для клонирования в плазмидный вектор и переносу в клетки *E.coli*. Таким образом, после клонирования и помещения на селективную среду с

антибиотиком отбираются колонии бактерий с плазидами, несущими кДНК. ДНК плазмид подвергают анализу для определения первичной структуры вставки кДНК. После того, как структура кДНК вставок из достаточного количества плазмид библиотеки была определена, проводится процедура формирования набора уникальных генов. По одному клону, представляющему каждый уникальный ген, отбирают для дальнейшей работы.

Отобранные клоны используют для наработки ДНК, которая будет нанесена на чип (рис.4.1). ДНК-продукт производится в ходе ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих участок плазмиды, несущей вставку кДНК. Так как структура этого участка у всех плазмид библиотеки одинакова, одна пара праймеров может амплифицировать кДНК вставку во всех клонах библиотеки. Этот прием позволяет значительно упростить и удешевить процедуру амплификации. Одна реакция амплификации дает материал, достаточный для нанесения «уникального» гена на 700-900 экземпляров чипа.

Работа по амплификации генов проводится в формате 96 луночных иммунологических планшетов при выращивании бактериальных культур и 96 луночных ПЦР плашек для ПЦР амплификации. Процедура наработки материала роботизирована и требует постоянного компьютерного мониторинга.

На рис. 4.2 представлены этапы работы автоматической рабочей станции для подготовки ПЦР реакций “Tecan RSP 100” (Genesis, USA). Робот смешивает компоненты ПЦР реакций в пластиковом контейнере (отмечен кружком на рисунке А) и заполняет смесью 96 луночные ПЦР планшеты (Рис.А). Затем машина отбирает 5 мкл бактериальной культуры из 96-луночных культуральных планшетов (Рис.Б), прокалывая металлическую предохранительную фольгу, и разбавляет бактериальный сток стерильной дистиллированной водой в соотношении 1/10 (рис. В). Разбавленную бактериальную культуру (5 мкл) используют как матрицу при проведении ПЦР реакции. Для этого манипулятор переносит разбавленные образцы в ПЦР-планшеты, заполненные реакционной смесью (Рис. Г).

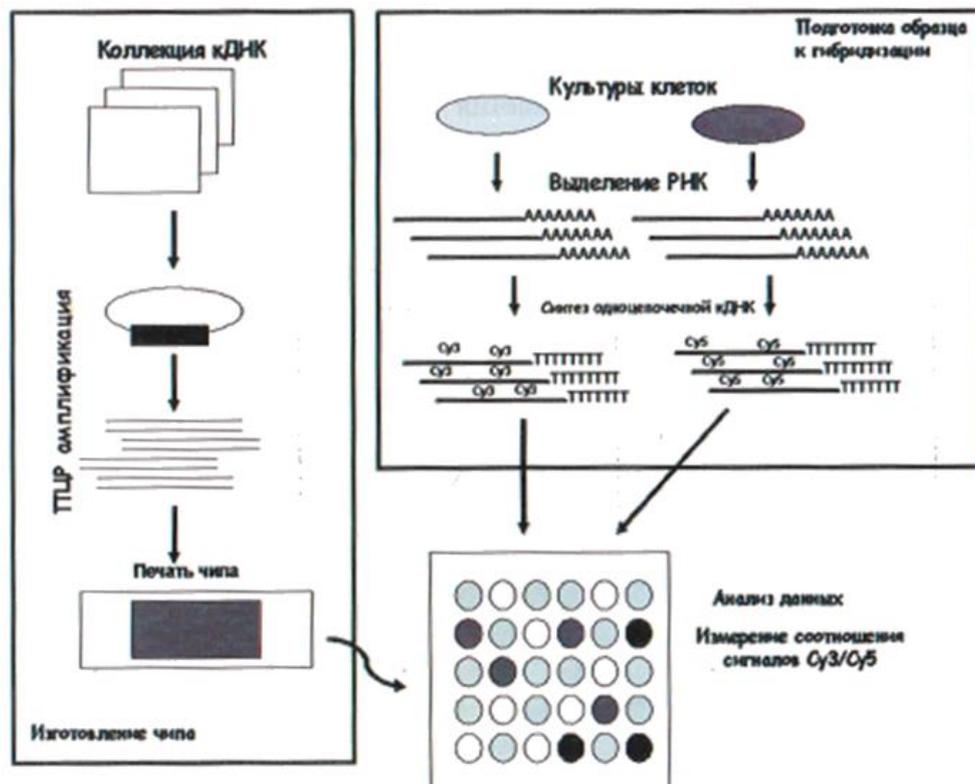


Рис. 4.1. Схема изготовления генных чипов на основе библиотек кДНК и подготовки образца к процедуре гибридизации.

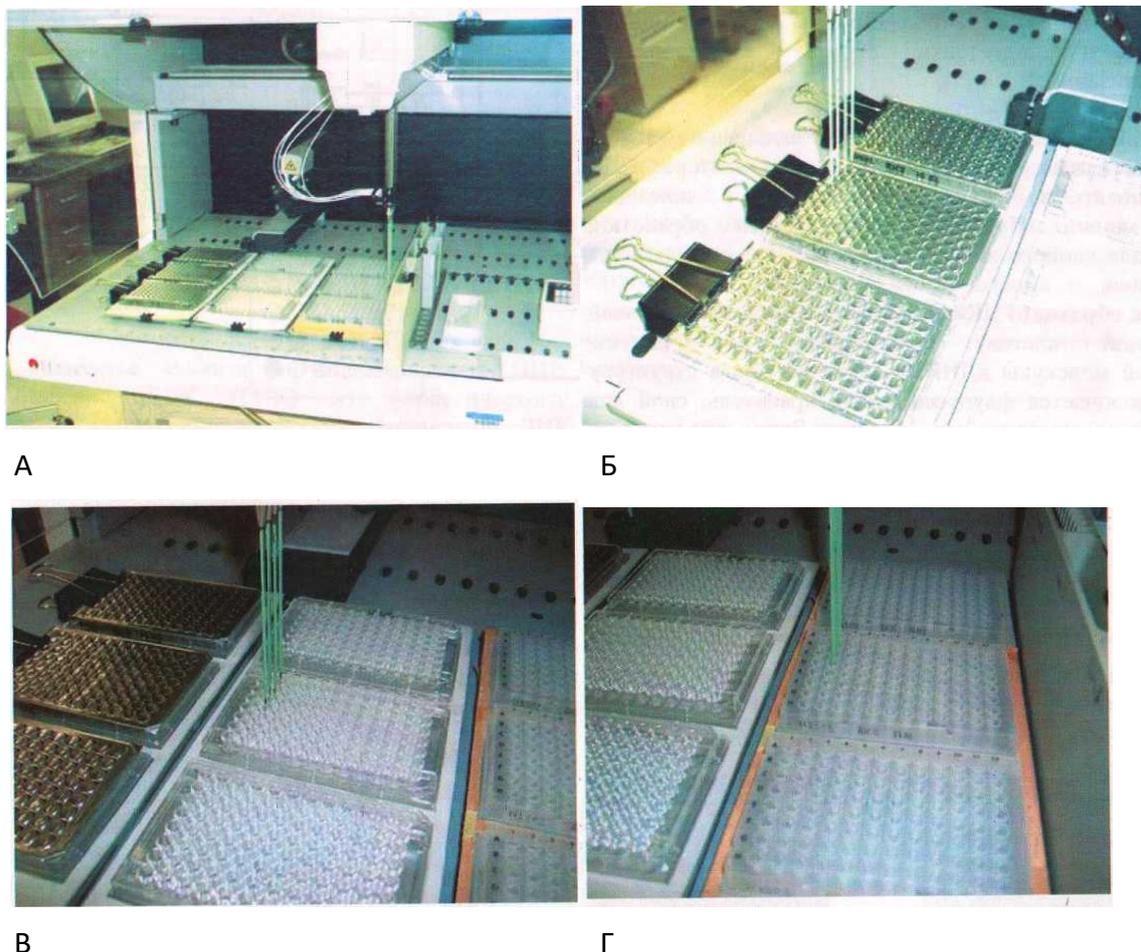


Рис. 4.2. Автоматическая рабочая станция для подготовки ПЦР реакций “Tecan RSP 100” (Genesis , USA).

**Изготовление чипа:** Вставки кДНК амплифицируют с использованием праймеров, специфичных для вектора. ПЦР продукты наносят на поверхность слайда с помощью печатающих машин. Путем соответствующей обработки, специфичной для данного вида подложки, ДНК закрепляют на поверхности чипа.

**Подготовка образца:** РНК из различных источников (тканей или популяций клеток) используется для синтеза одноцепочечной молекулы кДНК. В ходе синтеза в структуру молекулы включается флуоресцентный краситель, свой для каждого из двух исследуемых образцов. Затем оба меченых образца смешивают в небольшом объеме буфера и гибридизуют с зондами на поверхности чипа. Конфокальный флуоресцентный сканер используют для считывания данных. Соотношение интенсивностей  $Cy3/Cy5$  дает информацию об уровне экспрессии генов в разных условиях.

### Разработка набора зондов для олигонуклеотидных генных чипов

Работа над созданием набора олигонуклеотидов производится с использованием различных компьютерных алгоритмов. Многие из этих алгоритмов являются свободно распространяемым программным обеспечением и могут бесплатно использоваться учебными и научными учреждениями. Свою работу исследователь начинает с того, что создает коллекцию известных нуклеотидных последовательностей для генов данного организма. Для этого он может воспользоваться информацией с интернет сайтов NCBI (National Center for Biotechnology Information) или Tigr (The Institute for genomic research). Затем, базируясь на полученных данных, он создает набор уникальных генов - отсеивает повторяющиеся последовательности ДНК.

Компьютер анализирует набор «уникальных генов» и создает на его базе набор олигонуклеотидных зондов. Затем выбраковывает последовательности, не отвечающие критериям специфичности, т.е. сиквенсы, которые встречаются в других генах и могут приводить к перекрестной гибридизации и ложным сигналам. Прошедшие отбор олигонуклеотиды формируют набор зондов, позволяющий точно детектировать интересующие гены.

Разработанные олигонуклеотиды синтезируют химически, доводят до одинаковой концентрации, фасуют в 96 или 384 луночные планшеты, лиофилизируют и поставляют заказчику готовыми для немедленного нанесения на поверхность чипа.

### 4.3 Печать генных чипов

После того как ДНК зондов готова и находится в 96 или 384 луночных планшетах, она должна быть помещена на поверхность генного чипа. Это производится посредством печатающих устройств.

#### Технология струйной печати

Этот тип печати базируется на технологии, заимствованной из струйных принтеров. Образец ДНК впрыскивается на поверхность чипа через маленькое сопло печатающей головки.

В настоящее время используют 2 типа устройств для «бесконтактной» «струйной печати». «Пьезоэлектрический тип» использует колебания пьезокристалла для выталкивания из сопла порции наносимого образца. Размер капли в этом случае колеблется от 50 до 500 пиколитров. Печатающие устройства, построенные на технологии «nQUAD», состоят из микроскопических шприцев, управляемых соленоидами, и наносят на поверхность чипа капли строго одинакового размера. Объем капли в этих устройствах можно точно установить. Как правило, он составляет несколько нанолитров.

Таким образом, пьезоэлектрические устройства позволяют работать с каплями меньшего объема, но они менее точны и постоянны в отношении объема наносимых капель по сравнению с более дорогими «nQUAD» устройствами.

Струйная печать имеет несколько неоспоримых преимуществ:

1. Возможность регулировать объем наносимого образца.
2. Работа распыляющего механизма не зависит от свойств поверхности, на которой производится печать.
3. Устройства могут наносить образцы на пористые поверхности (мембраны).
4. Отсутствует опасность контаминации образцов через контакт с поверхностью чипа.
5. Отсутствует опасность повреждения поверхности чипа в ходе печати.

Однако при использовании струйной печати необходимо учитывать специфические проблемы, присущие этой технологии, прежде всего - влияние статического заряда поверхности подложки на траекторию движения распыляемых капель. Чтобы нейтрализовать это влияние, поверхность чипа необходимо искусственно ионизировать либо значительно повышать влажность воздуха в рабочей зоне. Если этого не делать, наносимые капли будут отталкиваться от поверхности чипа, и расположить их в правильном порядке станет невозможно. Вторая значительная проблема - разбрызгивание крупных капель при соударении с поверхностью чипа.

Перечисленных недостатков лишены устройства «контактной печати».

## Контактная печать (пин-принтинг)

Этот принцип основан на использовании твердых стержней (pins (англ.)). Их обмакивают в раствор образца, при этом небольшие объемы наносимого раствора остаются на кончике стержня. Стержень касается поверхности чипа и оставляет на ней микроскопическое пятно. Диаметр пятна зависит от силы поверхностного натяжения раствора наносимого образца, свойств поверхности чипа и материала печатающего стержня. Типичный объем наносимой капли измеряется нанолитрами. В начале развития технологии контактной печати стержни оканчивались острием и позволяли напечатать только одно пятно после каждого обмакивания стержня в раствор. Позже в теле стержня стали делать микроскопический канал (рис. 4.3). Таким образом, после обмакивания в раствор стержень забирает и удерживает в этом углублении некоторый объем раствора зонда. Эта конструктивная особенность позволяет наносить пятна на поверхности нескольких десятков чипов после каждого обмакивания стержней в раствор.

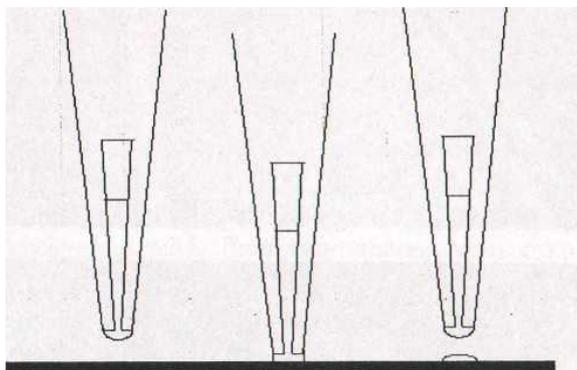


Рис. 4.3. Схема работы устройства контактной печати.

Преимущества технологии контактной печати: простота печатающих устройств, относительно низкая стоимость, маленький размер наносимых пятен, отсутствие разбрызгивания при печати, экономное расходование наносимого материала. Продукта одной реакции ПЦР амплификации достаточно для печати пятен соответствующего гена на поверхности примерно 700-900 слайдов.

Иллюстрируя экономичность данной технологии, можно привести технические характеристики печатающих стержней TeleChem ChipMaker2: объем образца удерживаемого во внутреннем объеме стержня 100-250 нанолитров, диаметр отпечатка на поверхности слайда 75-200 микрометров, объем наносимого образца 0.2-1.0 нанолитра.

Устройства контактной печати в настоящее время активно завоевывают рынок и становятся индустриальным стандартом в производстве генных чипов низкой плотности. Пример такого устройства – установка “OmniGrid 100” – приведен на рис.4.4.



Рис. 4.4. Печать генных чипов машиной “OmniGrid 100” (Gene Machines, USA).

Внешний вид установки. Автоматическая подающая система (1) и печатный столик (2) (на нем размещают стекла чипов). (Б) Крупный вид рабочей зоны. На фотографии видно, что печатающая головка и столик перемещаются по металлическим направляющим. Таким образом обеспечивается позиционирование чипов относительно блока стержней.

#### 4.4 Иммобилизация образцов на поверхности чипа

После того как ДНК нанесена на чип, она должна быть химически закреплена на его поверхности. Это достигается благодаря химическим реакциям между зондом и покрытием поверхности чипа. В настоящее время стандартным форматом подложки ДНК-чипов стали предметные стекла, ранее используемые в микроскопии. Их поверхность покрывают различного рода химическими агентами для обеспечения ковалентного связывания ДНК. Многие химико-биологические фирмы (Corning Microarray Technology, Cel, TeleChem International (USA)) производят и продают стеклянные слайды, поверхность которых модифицирована и несет реакционно-способные альдегидные или аминогруппы. Стекла, подобные «коммерческим», можно изготовить в лабораторных условиях путем нанесения полилизина на поверхность предметных стекол.

Технология так называемого «концевого закрепления» позволяет ковалентно пришивать на поверхность чипа «аминомодифицированную» ДНК зонда. В этом случае для печати чипа используют зонды, полученные реакцией ПЦР амплификации с праймерами, содержащими на 5' конце аминомодифицированный нуклеотид или синтетические олигонуклеотиды «аминомодифицированные» с 5' конца.

#### 4.5 Гибридизация

После того, как чип изготовлен или приобретен, наступает время для его использования, т.е. гибридизации чипа с меченой ДНК-мишенью.

##### Системы, используемые для мечения образца

Выбор метки в общем случае зависит от используемой системы сканирования. Как правило, используют пару флуоресцентных красителей Cy3 и Cy5, излучающих свет с разной длиной волны.

Таблица 3.

Свойства флуоресцентных красителей

Краситель	Длина волны возбуждающего света	Длина волны испускаемого света	Цвет, видимый при сканировании чипа
Cy3	550 нм	570 нм	Зеленый
Cy5	649 нм	670 нм	Красный

Красители включаются в структуру ДНК мишени либо в процессе обратной транскрипции (если для мечения используется мРНК), либо в результате реакции **мультипрайминга**, если метится геномная ДНК. Процедура мечения может проводиться в одну стадию или быть двухстадийной.

В первом случае используются измененный нуклеотид уридин (Cy3-UTP, Cy5-UTP), ковалентно связанный с красителем. После завершения реакции и очистки ее от невключившихся нуклеотидов продукт немедленно готов к гибридизации.

В случае непрямого мечения, проводится реакция обратной транскрипции с использованием нуклеотида AA-UTP (5-(3-аминоаллил)-2'-дезоксинуридин-5'-трифосфат). Вторая химическая реакция проводится между AA-кДНК и эфирами Cy-красителей (т.е.

молекулами Cy3 и Cy5, снабженными эфирными группами). Химическая реакция между аминоаллил группами кДНК и эфирными группами красителей приводит к более равномерному включению молекул флуорофора в молекулу кДНК, чем в случае одностадийного мечения.

В настоящее время флуорофоры Cy3 и Cy5 завоевали рынок, но эта пара красителей не лишена недостатков. Основной из них - светочувствительность. Особенно плох в этом отношении Cy5.

Если не удастся провести успешное сканирование чипа за 2 прохода сканера, третий проход, как правило, показывает значительное снижение интенсивности флуоресценции в красном канале. Это указывает на то, что Cy5 разрушился в процессе облучения возбуждающим лазером (подробнее см. далее). В начале 2004 года компания Invitrogen вышла на рынок с новой технологией RLS (Resonance Light Scattering). Эта технология имеет большое будущее и возможно скоро заменит красители Cy3 и Cy5. RLS базируется на использовании коллоидного золота и серебра для мечения молекул мишеней.

Будучи возбуждены, они испускают свет в разных спектральных диапазонах и могут быть легко детектированы.

Преимущества данной технологии: отсутствие явления ослабления сигнала после повторных проходов сканера; возможность длительного хранения - чипы, помеченные системой золото-серебро, могут храниться годами без потери качества сигнала. И, наконец, система примерно в 10 раз более чувствительна по сравнению с существующей, основанной на красителях Cy3 и Cy5.

В тех случаях, когда не требуется высокая чувствительность детекции, а также не велика разрешающая способность систем считывания, исследуемые молекулы метят хромогенными субстратами. Последующая ферментативная реакция позволяет обнаружить зонды, связавшиеся с молекулами-мишенями. Интенсивность цветовых сигналов дает информацию о количественном составе исследуемого образца.

Хромогенные субстраты используют, как правило, в «макроэреях» т.е. чипах, состоящих из элементов, физические размеры которых сравнительно велики. Примером макроэрея может служить «мембранный генный чип». ДНК элементы этого чипа достигают в диаметре нескольких миллиметров и закреплены на поверхности гибкой нейлоновой или нитроцеллюлозной мембраны. Большой размер элементов чипа позволяет отказаться от использования дорогостоящих систем считывания.

Тем не менее, считывание информации невооруженным глазом, несомненно, ведет к менее точной количественной оценке.

## 4.6 Считывание информации

После завершения процедуры гибридизации меченые молекулы ДНК, комплементарно связанные с зондами на поверхности чипа, будут испускать флуоресцентные сигналы, которые должны быть измерены и проанализированы.

Флуоресцентные сигналы детектируют, освещая поверхность чипа светом с длинной волны, возбуждающей флуоресценцию, и затем измеряют излучаемый сигнал.

Например, Cy3, возбужденный излучением HeNe лазера, излучает свет с длинной волны 570 нм. Источником возбуждающей флуоресценцию излучения могут быть лазер или лампа высокой мощности. Лазеры дают мощный поток света и обеспечивают высокую чувствительность, но могут излучать только в одной спектральной области. Лампы дают полихроматический свет, но излучение значительно уступает лазеру по мощности.

## Системы прямого считывания

Системы прямого считывания состоят из источника возбуждающего излучения, как правило, это дуговая лампа, облучающая всю поверхность слайда, и высокочувствительной цифровой CCD камеры, снабженной необходимыми оптическими фильтрами. Таким образом, интенсивность сигнала от определенного пикселя матрицы соответствует интенсивности излучения соответствующей зоны чипа.

Основное достоинство данной системы - простота, отсутствие подвижных частей и высокая скорость считывания данных (весь слайд считывается за один раз). К недостаткам можно отнести низкое разрешение и чувствительность.

## Сканирующие системы

Сканирующий детектор представляет собой конфокальный флуоресцентный микроскоп, движущийся над поверхностью слайда. Микроскоп освещает маленький участок поверхности слайда через объектив и собирает излучаемый флуоресцентный сигнал через тот же объектив. Достоинство сканирующих систем - высокая чувствительность и превосходное разрешение.

Особый интерес представляет прибор «ЕВРОБИО-ВТО» (рис. 4.5.) рекомендованный национальным стандартом Российской Федерации: «Биологическая безопасность «СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ» Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа». Отличительной особенностью этого прибора является то, что анализ осуществляется на основе сравнения оптической плотности в исследуемых зонах матрицы и зонах положительного/отрицательного контроля и конечным результатом является создание и распечатка протокола испытаний. Данный протокол был подтвержден ГОСТ Р 52174- 2003.



**Рис. 4.5.** Аппаратно - программный комплекс «ЕВРОБИО-ВТО» для анализа биочипов (слева) и рамка для фиксации микрочипов. Микрочип на предметном стекле с нанесенными биообразцами. Пластиковый светофильтр для проверки настроек чип-детектора.

## 4.7 Применение ДНК чипов

### Исследование дифференциальной экспрессии генов

Для исследования дифференциальной экспрессии генов ПЦР продукты клонов библиотеки кДНК, известной первичной структуры, наносят на поверхность чипов. Затем мРНК из исследуемого и контрольного образцов подвергаются обратной транскрипции для того, чтобы получить смесь меченых кДНК мишеней. В ходе обратной транскрипции флуоресцентный краситель включается в синтезируемые молекулы кДНК (краситель одного типа используется для экспериментального образца, краситель другого типа для контрольного). Смесь двух типов мишеней затем используется для гибридизации с чипом.

Измеряя соотношение флуоресценции двух разных красителей, можно сделать заключение о том, какие гены в экспериментальном образце экспрессируются сильнее или слабее по сравнению с контрольным образцом.

Метод позволяет исследовать закономерности генной экспрессии в организмах или тканях в ответ на внешние стимулы (лекарственные препараты, токсины, стрессы) и изучать изменение картины транскрипции в ходе протекания биологических процессов, таких, например, как клеточная дифференцировка.

### Генное картирование

В этом случае генные чипы используют для поиска полиморфизма последовательностей ДНК, точечных мутаций, небольших делеций или, наоборот, включений ДНК в определенные места исследуемой хромосомы.

Упорядоченные клоны ДНК из исследуемой хромосомы наносятся на подложку чипа. Затем чип гибридизуется с меченой ДНК двух организмов. Один из них проявляет симптомы наследственного заболевания или является носителем мутантного фенотипа, второй используется в качестве контроля.

Различия гибридизационной картины позволяют идентифицировать различия и выявить изменения в гене, ответственном за наблюдаемую симптоматику.

### Анализ многокомпонентных биологических систем

Одной из самых простых, но и наиболее востребованных областей применения генных чипов является анализ многокомпонентных биологических систем (организм-патоген, хозяин-паразит и т.д.). В том случае, если необходимо одновременно детектировать присутствие нескольких молекул мишеней, биологические микрочипы обладают неоспоримым преимуществом перед системами, где каждая из мишеней анализируется индивидуально.

Частным случаем данной модели можно считать анализ пищевых продуктов на наличие в них генетически измененных источников. Пищевой продукт является сложной смесью биологических образцов, а трансгенный источник - одним из ее компонентов. Закрепив на поверхности чипа зонды, соответствующие различным трансгенным источникам, можно определить, который из них был использован в производстве.

Мишенями, в данном случае, являются ПЦР продукты различных маркерных и целевых генов. Использование для гибридизации ПЦР-продуктов позволяет одновременно решить несколько задач: ввести в ДНК-мишень метку, получить молекулу нуклеиновой кислоты, способную гибридизоваться с зондом, и усилить сам сигнал, поднимая, таким образом, чувствительность метода.

Первый генный чип «GMOChip Test Kit», предназначенный для определения ГМ-составляющих в продуктах питания, был разработан и успешно представлен на рынок немецкой компанией GeneScan Europe AG в 2001 году.

Тестовый набор выпускается в двух комплектациях на 25 и 50 генных чипов. Кроме необходимых для работы химических реагентов, набор комплектуется программным обеспечением для анализа результатов анализа (Signalysе®). Версия «Европа» детектирует присутствие ДНК нескольких видов растений, вирусов, элементов генетических конструкций, и предназначен для идентификации сортов растений, разрешенных к применению на территории Евросоюза. Среди элементов чипа: ДНК, видоспецифичная для растений сои, кукурузы, масличного рапса, риса, нескольких рас вируса мозаики цветной капусты, ряда трансгенных сортов кукурузы и сои. Чип определяет присутствие в образце ДНК промотора 35SCaMV, терминатора *nos*, генов *bar* и *pat*.

Компании GeneScan-Europe и Clinical Micro Sensors в настоящее время работают над разработкой генного чипа на базе технологии “eSensor”. Создан работоспособный образец, пригодный для использования в стационарных лабораториях.

Однако компании признают, что технология нуждается в существенных доработках, прежде чем станет пригодна для широкого «полевого» применения. Дело в том, что образец исследуемой ДНК нуждается в продолжительной химической обработке, предшествующей нанесению на чип. Как и все генные чипы, “eSensor” способен одновременно тестировать образец на присутствие множества ДНК мишеней.

Таким образом, образец будет проходить единичный анализ для одновременного обнаружения наличия нескольких десятков генетических модификаций.

## 5. Технология рекомбинантных ДНК

Технология рекомбинантных ДНК (ее называют также молекулярным клонированием или генной инженерией) - это совокупность экспериментальных процедур, позволяющих осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой. Организмы, полученные при помощи генно-инженерных манипуляций, называют трансгенными или генетически модифицированными

В общем, процесс переноса включает четыре основных этапа (рис.5.1):

1. **создание рекомбинантной генетической конструкции.** На этом этапе производится встраивание нужного фрагмента ДНК (**вставки**) в другую молекулу ДНК (**вектор**). Для выделения, анализа и конструирования генов используют клетки прокариот.
2. **введение ДНК в клетку-хозяина.** Получившуюся молекулу рекомбинантной ДНК вводят в клетку - хозяина (реципиент), где она **реплицируется** (размножается) либо самостоятельно, либо интегрируется в хромосому и передается потомкам.
3. **идентификация и отбор клеток, несущих рекомбинантную ДНК.** Производится на селективной среде, на которой могут вырасти только трансформированные клетки.
4. **анализ экспрессии перенесенного гена.** Получение специфического белкового продукта, синтезирующегося клетками-хозяевами, служит подтверждением их трансгенной природы.

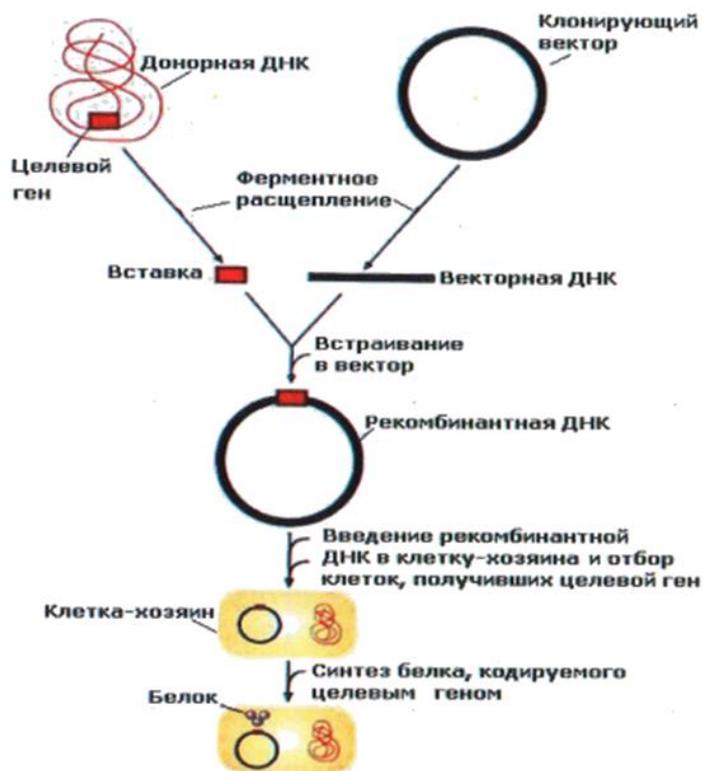


Рис. 5.1. Клонирование рекомбинантной ДНК

### 5.1 Клонирование рекомбинантной ДНК

#### Встраивание переносимого гена в вектор. Структура прокариотических векторов

Источниками новых генетических последовательности служат *библиотеки кДНК*, полученные путем *обратной транскрипции* мРНК, выделенной из организма-донора. При конструировании генов могут быть использованы синтетические последовательности ДНК

(олигонуклеотиды), а также продукты амплификации со специфическими праймерами определенных последовательностей геномной ДНК. На данном этапе работы потенциальную вставку подвергают ферментативному гидролизу и соединяют ("сшивают") с другой ДНК (вектора), обработанного аналогичными ферментами. Для точного расщепления ДНК используют **эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) II типа**. Эти ферменты узнают специфические инвертированные повторы в структуре ДНК и симметрично разрезают фосфодиэфирные связи в каждой цепи. Восстановление связей при "сшивании" (лигировании) фрагмента и вектора, в присутствии АТФ, выполняет другой фермент - **лигаза**.

**Вектором** может быть любой небольшой внехромосомный элемент (например, плазида, ДНК бактериофага или вируса). Каждый из этих элементов встречается в природе в клетках определенных видов, и большинство из них реплицируется только в природном хозяине или клетках близкородственных видов.

Как уже упоминалось, клонирование сегментов ДНК различного происхождения проводят в клетках прокариот, в частности, в клетках *Escherichia coli* (**кишечной палочки**). В качестве **клонировующих векторов** в этом случае используют **плазмиды**. Это внехромосомные, автономно реплицирующиеся кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК. Плазмиды есть практически у всех бактерий. Одни из них содержат информацию, обеспечивающую их собственный перенос из одной клетки в другую (F-плазмиды), другие несут гены устойчивости к антибиотикам (R-плазмиды) или другие специфические гены. Каждая плазида содержит сайт начала репликации (**ori**), без которого репликация плазмиды в клетке-хозяине невозможна. Высококопийные плазмиды представлены в клетке 10-100 копиями, низкокопийные - 1-4 копиями.

Плазмиды обладают всеми основными свойствами, которые позволяют использовать их в качестве вектора для переноса клонируемой ДНК. Однако рекомбинантные плазмиды, используемые в практике генной инженерии отличаются от плазмид дикого типа: 1)небольшим размером; 2)наличием **уникальных сайтов** для рестриктаз (специфических последовательностей, каждая из которых встречается в плазмиде только один раз); 3) наличием 1-2 х селективных маркерных генов для отбора трансформированных клеток (чаще всего это гены устойчивости к антибиотикам -тетрациклину, ампициллину, канамицину и др.)

**Экспрессирующие векторы**, отличаются от клонирующих наличием в своем составе, помимо указанных выше элементов, последовательности сильного (часто регулируемого) промотора, старт-кодона, участка связывания с рибосомой и сайта терминации транскрипции. При помощи векторов этого типа можно осуществлять экспрессию клонированных генов как бактериального происхождения, так и **гетерологичных** (растительных и животных) под контролем регуляторных элементов *E.coli* и получать рекомбинантные белки.

Генетическая карта типичного плазмидного вектора, использующегося для клонирования и экспрессии генов в клетках *E.coli*, представлена на рисунке 5.2.

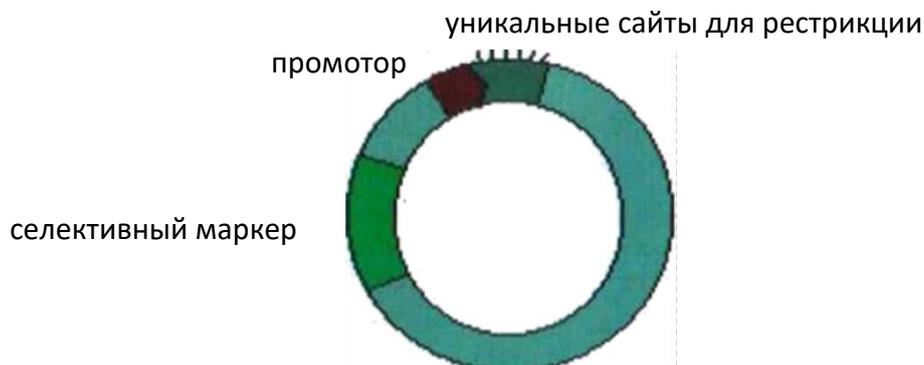


Рис. 5.2 Плазмидный вектор

## Трансформация

Методы введения ДНК специфичны для клеток каждого типа (подробнее см. ниже). Перенос ДНК может осуществляться напрямую или с использованием природных механизмов.

Введение свободной ДНК в бактериальную клетку проводят либо при помощи прямой трансформации, либо конъюгации.

**Трансформация** - способ прямого введения свободной ДНК в бактериальную клетку. Чтобы обеспечить проникновение ДНК в клетки, их обрабатывают ледяным раствором хлорида кальция. Другой способ увеличения проницаемости клеточной мембраны - воздействие электрическим током. **Конъюгация** - природный механизм передачи плазмид. Многие природные плазмиды несут в своем составе гены, экспрессия которых вызывает образование контактов между бактериальными клетками и перенос ДНК. Однако рекомбинантные плазмиды, используемые в лабораторной практике, лишены этих свойств, и для проведения конъюгативного переноса необходимо наличие в клетке дополнительной плазмиды, несущей конъюгативные свойства. К конъюгации прибегают в том случае, когда необходимо трансформировать бактериальные клетки, с трудом поддающиеся трансформации другими способами.

## Отбор трансформантов и анализ экспрессии перенесенного гена

Ни один метод перенесения ДНК в клетку не может обеспечить 100% попадания. Часть клеток оказывается нетрансформированными, часть получает вектор без вставки. Для первичного **отбора трансформированных клеток** применяют различные **селективные гены**, детерминирующие какие-либо отличительные фенотипические особенности: возможность детоксикации антибиотика, утилизации определенного субстрата или роста на обедненных средах. По возможности роста на селективной среде производится отбор клеток, получивших векторную ДНК.

Далее проводится отделение нужных клонов (*клон-группа генетически однородных клеток, образовавшихся в результате деления одной клетки*). Анализ может базироваться на определении самого перенесенного гена либо быть связанным с его функцией (продуктом экспрессии гена). Основные методы анализа генетически-модифицированных организмов приведены в Таблице 4.

Таблица 4.

**Методы анализа трансформированных клеток и трансгенных организмов**

Группа методов	Основные принципы
Гибридизация	Изолируют тотальную ДНК, обрабатывают рестриктазами и фракционируют при помощи гель-электрофореза. Денатурируют ДНК в геле и переносят на нейлоновую мембрану. Мембрану инкубируют с денатурированным (или одноцепочечным) радиоактивным фрагментом (зондом), гомологичным перенесенному гену. Отожженный зонд детектируют при помощи радиоавтографа. Аналогично проводят гибридизацию ДНК-зонда с тотальной мРНК, выделенной из трансформированных клеток.
Полимеразная цепная реакция	Проводят амплификацию последовательности перенесенного гена при помощи специфических праймеров. Идентификацию ПЦР-продуктов проводят при помощи гель-электрофореза.

Фенотипический отбор	Анализ основан на использовании специфических свойств, проявляемых нужным клоном. К ним относятся морфологические изменения трансформированных клеток (например, характера их роста) или синтез определенных соединений, которые можно идентифицировать при помощи стандартных биохимических методов.
Иммунохимический анализ	Для проведения идентификации белка, кодируемого перенесенным геном, используют специфические антитела. Детектирование связывания антител с нужным белком проводят при помощи вторичных антител, специфичных в отношении первых, меченых ферментом или радиоактивной меткой.

## Структура эукариотических векторов

Если после клонирования и анализа генетических последовательностей в клетках *E. coli*, для дальнейшей работы, необходимо перенести клонированный сегмент в клетки другого вида, его можно снова выделить из *E. coli*-вектора и клонировать в векторе, совместимом с другими клетками-хозяевами. Для того, чтобы сократить количество манипуляций, клонирование проводят сразу в так называемом **челночном векторе**, который способен существовать как в клетках *E. coli*, так и в альтернативном хозяине. Вектор этого типа содержит две области *ori*, соответствующие каждому из двух видов хозяев, а также гены, необходимые для репликации и не предоставляемые клеткой-хозяином. Большинство современных эукариотических векторов являются челночными.

Итак, помимо последовательностей, необходимых для поддержания такого вектора в клетках двух типов, челночный вектор должен содержать: 1) эукариотический селективный маркер; 2) эукариотический промотор; 3) эукариотические сайты терминации транскрипции и трансляции; 4) сигнал полиаденилирования ДНК. Подробно строение векторов для трансформации клеток растений и животных будет описано в соответствующих разделах.

## 5.2 Трансгенные растения

История использования технологии рекомбинантных ДНК для создания растений с полезными свойствами насчитывает всего несколько десятков лет. Только в 1983 году были опубликованы первые работы по получению трансгенных растений табака, содержащих в качестве чужеродных генов селективные маркеры устойчивости.

Однако уже через три года были проведены первые испытания сельскохозяйственных генетически модифицированных растений, а в 1994 году в США получены первые официальные разрешения на коммерциализацию трансгенных сортов растений. Площади, занятые трансгенными культурами, стремительно возрастают: с 1.7 млн га в 1996 году, когда началось их возделывание в коммерческих масштабах, до 90 млн. га. в 2005 году.

### Методы переноса генов в клетки растений

Растительные клетки не содержат плазмид, поэтому для переноса генов в растения в качестве трансформирующих векторов в основном используют рекомбинантные векторы на основе **Ti-плазмиды** почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*.

*A. tumefaciens* - фитопатоген, который в процессе своего жизненного цикла трансформирует клетки растений. Трансформация приводит к образованию так называемого **корончатого галла** - опухоли, нарушающей нормальный рост растения. Причиной

трансформации является проникновение и интеграция в геном растения специфического фрагмента **ДНК Т-ДНК** агробактериальной Ti-плазмиды (рис.4А).

Ti-плазмиды имеют размер от 150 до 250 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов) и содержат разнообразные уникальные гены. Одна часть этих генов экспрессируется исключительно в бактериальных клетках, другая - в эукариотических (рис.4А). Поврежденные клетки растения, с нарушенной клеточной стенкой, выделяют специфические фенольные соединения, которые служат индукторами инфекционного процесса у агробактерий. Области Т-ДНК фланкированы прямыми повторами длиной 25 п. н. (**LB** и **RB** - от англ. Left Border и Right Border). Индукция **v/r-генов**, ответственных за перенос Т-ДНК, сопровождается появлением одноцепочечных разрывов, внутри L и R-границ. После прикрепления агробактерии к растительной клетке и активации системы переноса, Т-ДНК переносится в растительную клетку и интегрируется в геном растения.

Т-ДНК несет в своем составе гены, ответственные за образование корончатого галла. Их экспрессия начинается уже после переноса Т-ДНК в растительную клетку. В состав Т-ДНК Ti-плазмиды дикого типа входят гены, кодирующие ферменты, катализирующие синтез ростовых факторов (фитогормонов класса *цитокининов* и *ауксинов*), избыточное присутствие которых в растительной клетке и приводит к злокачественному росту. Кроме этих генов, Т-ДНК каждой специфической плазмиды содержит ген, определяющий синтез одного из соединений класса **опинов** (*нопалина*, *октопина*, *агропина* и др.). Соединения этого класса секретируются опухолевыми клетками и используются агробактериями в качестве источника азота и углерода.

Рекомбинантные векторы на основе Ti-плазмид являются *неонкогенными*, т.к. лишены последовательностей, кодирующих ферменты опухолевой трансформации. На место этих генов, между границами Т-ДНК встраивается чужеродный ген, который нужно перенести в растение и селективный маркер для отбора трансформантов. Подробнее об основных элементах растительных векторов см. ниже.

Наиболее популярным вектором на основе Ti-плазмиды является **бинарный** (челночный) вектор, который содержит два *ori* для репликации плазмиды в клетках агробактерий и *E.coli*, границы Т-ДНК, однако лишен *vzr*-генов. После клонирования генов в *E.coli*, такой вектор переносят в агробактериальный штамм, содержащий плазмиду - помощник с *vzr*-функцией, но без Т-ДНК. Благодаря действию *vzr*-генов в *транс положении*, Т-ДНК может быть перенесена в клетки растений (рис.5.3).

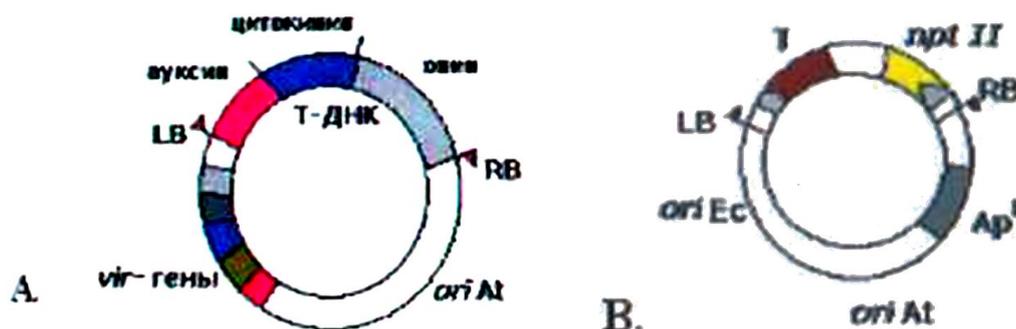


Рис.5.3 Генетические карты Ti-плазмиды дикого типа (А) и бинарного вектора (В).

Обозначения: *ori Ec* и *ori At* - точки начала репликации для *E.coli* и агробактерии соответственно; *Ap<sup>r</sup>* - селективный маркер для отбора клеток *E.coli*, *nptII* — селективный маркер для отбора растительных трансформантов под контролем агробактериального промотора; Т - переносимый ген под контролем рекомбинантного промотора. Дополнительные пояснения в тексте.

Общая схема агробактериальной трансформации представлена на рисунке 5.4.

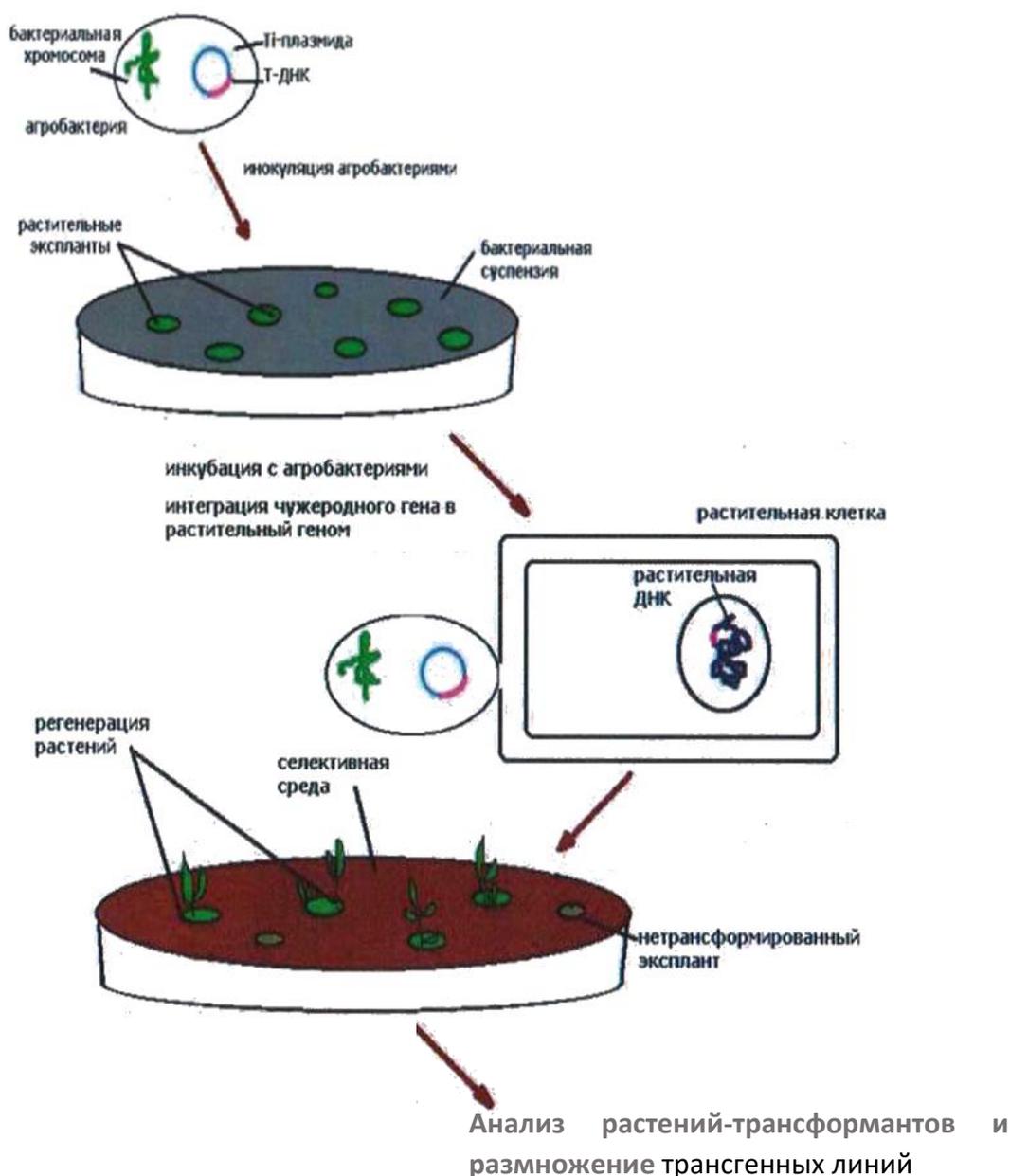


Рис.5.4. Общая схема агробактериальной трансформации

После инкубации растительных **эксплантов** (это могут быть фрагменты проростков, листья, черешки, сегменты стебля, дедифференцированные клетки и др.) или клеток суспензионной культуры с культурой рекомбинантных агробактерий, их помещают на селективную среду, содержащую, помимо селективного, еще и бактериостатический агент для элиминации агробактерий.

В основе технологии получения целых растений из отдельных клеток лежит явление **тотипотентности**. Добавление в среду **фитогормонов** (ауксинов и цитокининов), в определенных для каждого вида растений пропорциях, приводит к делению трансформированных клеток и **регенерации** целых растений. Все манипуляции проводятся в условиях стерильной культуры. Условия регенерации растений специфичны для каждого вида растений.

Однако агробактериальная система трансформации применима далеко не для всех видов растений. В природных условиях агробактериальной трансформации подвержены только двудольные растения (виноград, фруктовые деревья, розы и др.). Однодольные растения, в число которых входят основные зерновые культуры (рис, пшеница и кукуруза),

практически не трансформируются агробактериями. Для таких видов растений применяют методы прямого переноса ДНК в клетки.

Для **прямого переноса генов** в растительные клетки в основном используются растительные *протопласты*. Обработка растительной клетки *целлюлазами* или *пектиназами* приводит к гидролизу жесткой клеточной стенки и в результате остается протопласт, окруженный только плазматической мембраной, проницаемой для ДНК. После трансформации протопласты восстанавливают клеточную стенку, и затем из них также возможно регенерировать целые растения.

При проведении **электропорации** растительные протопласты помещают в раствор рекомбинантной ДНК высокой концентрации и действуют на них высоковольтным импульсом. В результате молекулы ДНК поглощаются клетками через поры в клеточной мембране. Для трансформации протопластов иногда применяются методы микроинъекции ДНК в ядро и упаковки ДНК в липосомы. **Бомбардировка микрочастицами (биолистика)** - второй по популярности метод трансформации растений и основной в случае трансформации однодольных растений.

Для проведения трансформации частицы золота или вольфрама диаметром 0.4-1.2 мкм покрывают плазмидной ДНК и "выстреливают" ими в клетки из "пушки", приводимой в действие пороховым зарядом, сжатым воздухом или гелием. При этом частицы разгоняются до скорости 300- 600 м/с и пробивают клеточную стенку и мембраны клетки. Попав в клетку, генетический материал, нанесенный на частицы, интегрируется в растительную ДНК.

Эксплантами для бомбардировки микрочастицами могут служить как культуры клеток и тканей растений, так и незрелые зародыши или пыльца. Биолистическая трансформация применяется при получении **транспластомных** растений (растений, содержащих чужеродные гены не в ядерном геноме, а в составе генома хлоропластов или митохондрий).

Еще одна возможность конструирования векторов для растений связана с использованием **фитовирусов**. Вирусные векторы чаще используют для получения в клетках растений ценных рекомбинантных белков не растительного происхождения. Чужеродные гены встраиваются в геном вируса путем слияния с вирусными генами или замены их части. Вирусная ДНК не встраивается в геном растительной клетки, однако, целевой белок нарабатывается в больших количествах в клетках, инфицированных вирусом. Такая экспрессия носит название **транзиентной** (временной).

## Принципы конструирования векторов для трансформации растений

В качестве промотора для экспрессии перенесенных генов чаще всего используют промотор **35S РНК вируса мозаики цветной капусты (P35SCaMV)**. Промотор 35SCaMV является *конститутивным* (постоянно работающим) и обеспечивает экспрессию целевого гена во всех тканях растений.

Данный промотор обеспечивает очень высокий уровень экспрессии перенесенных генов как в клетках двудольных, так и однодольных растений. В ряде случаев при трансформации растительной клетки генами растительного и животного происхождения, собственный промотор гена заменяют на 35SCaMV промотор, чтобы повысить выход белкового продукта. Более слабыми, чем 35SCaMV, являются промоторы агробактериальных генов *нопалин-* и *манопинсинтаз*, которые тоже широко используются при конструировании растительных векторов.

Для получения картины избирательной экспрессии перенесенного гена в различных тканях растения наиболее приемлемы **тканеспецифические промоторы**. Так, для накопления целевого белка в клубнях используют промотор запасного белка *пататина*. Для создания растений с признаком мужской стерильности широко используется *тапетум-специфический* промотор, позволяющий экспрессировать ген рибонуклеазы, обеспечивающий стерильность

пыльцы, только в клетках пыльников. Для накопления рекомбинантного белка в тканях запасяющих органов используют сильные промоторы генов запасяющих белков семян: фазеолина и конглицинина (из фасоли), зеина (из кукурузы), глюteniна (из пшеницы).

Для того, чтобы экспрессия гена протекала в только определенных условиях, его снабжают **индуцибельным промотором**. С его помощью легко проводить “включение-выключение гена”. Примерами таких промоторов могут быть *металл-индуцибельные, светочувствительные и индуцируемые поранением ткани* промоторы, а также промоторы генов белков теплового шока.

Гены, переносимые в растения, снабжают также 3' концевым сигналом полиаденилирования РНК. Для этих целей применяются последовательности растительного происхождения, агробактериальные (генов нопалин- и октопинсинтаз) и вирусные (35SCaMV).

Часто гены, переносимые в растения, имеют бактериальное происхождение или бывают получены путем обратной транскрипции растительной мРНК, и потому лишены интронов.

Введение в состав генетической конструкции интрона помогает увеличить уровень экспрессию переносимого гена в растительной клетке (особенно это актуально для однодольных растений).

Помимо интронов в состав рекомбинантных конструкций могут входить последовательности, узнаваемые регуляторными системами растительной клетки, как, например, 5'-концевые нетранслируемые регионы (5'UTR) или энхансеры. А также последовательности, кодирующие сигналы внутриклеточной локализации для доставки синтезированного белка в ЭПР, хлоропласты или др. органеллы клетки (N- и C-концевые транзитные пептиды)

Для выявления экспрессии перенесенных генов в трансформированных клетках и отбора трансформантов применяют селективные и репортерные гены.

В современных векторах для трансформации растений в качестве **селективных маркерных** генов обычно используют прокариотические гены ферментов, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам, под контролем эукариотических регуляторных элементов. **Репортерные гены (скринируемые маркеры)** позволяют не только идентифицировать трансформированные клетки, но и количественно оценивать уровень экспрессии перенесенных генов в экстрактах, и в интактных тканях. Продукты репортерных генов имеют специфическую активность, отсутствующую в клетках трансформированного растения, а экспрессия этих генов никак не сказывается на метаболизме растительной клетки.

Таблица 5.

**Некоторые селективные и репортерные гены, использующиеся при получении трансгенных растений**

фермент	ген	селективный агент
Неомицинфосфотрансфераза	neo(nptII)	антибиотик канамицин
Гигромицинфосфотрансфераза	hpt	антибиотик гигромицин
Фосфинотрицинацетилтрансфер	bar	гербицид фосфинотрицин
фермент	ген	метод анализа
Нопалинсинтаза	nos	окрашивание нопалина флуоресцентным красителем
β-глюкуронидаза	gus	гидролиз синтетического глюкоуронида
Люцифераза	lux	приводит к образованию окрашенного продукта

Зеленый флуоресцентный белок (GFP)	gfp	биолюминисценция флуоресценция в зеленой области спектра при облучении длинноволновым УФ
------------------------------------	-----	---

### 5.3 Применение трансгенных растений

Сегодня список генетически модифицированных культурных растений включает следующие виды: **soя**, клюква, горох, земляника, огурец, баклажан, перец, **сахарная свекла**, люцерна, **лен**, слива, сахарный тростник, хрен, тополь, арбуз, овес, батат, спаржа, **картофель**, просо, капуста, киви, малина, **табак**, морковь, латук, **рис**, арахис, сельдерей, дыня, рожь, орех, **кукуруза**, виноград, **томат**, лилия, пион, **канола (рапс)**, гевея, груша, **папайя**, ель, **пшеница**, **гвоздика**, береза, сосна, шпинат, гербера, петуния, роза, банан, бобы, **хлопчатник**, **дыня**, сорго, ячмень, арабидопсис, лотос, орхидея, подсолнечник, яблоня, **тыква**, **цикорий** и многие другие.

Среди коммерциализированных сортов генетически-модифицированных растений (**выделены жирным шрифтом**) в настоящее время преобладают соя, кукуруза, хлопчатник и канола.

В течение 19-летнего периода (1996-2005гг.) выращивания трансгенных культур в мире, наиболее популярными остаются сорта с улучшенными агротехническими характеристиками, и в частности, содержащие гены устойчивости к гербицидам и к насекомым-вредителям.

#### Устойчивость к гербицидам

Принципиально новые и высокоэффективные гербициды, такие как глифосат, атразин, хлорсульфурон, глюфосинат (фосфинотрицин) и бромоксинил появились на рынке еще в начале 70-х годов. Они быстро завоевали популярность, потому что благодаря широкому спектру их действия, сильно сократилась потребность в использовании большого количества узкоизбирательных гербицидов. Однако гербициды нового поколения оказались неидеальными из-за серьезного недостатка способности не только воздействовать на сорняки, но и подавлять многие культурные растения, поскольку их молекулярными мишенями являются ферменты, участвующие в ходе универсальных реакций растительного метаболизма, таких как фотосинтез, дыхание или биосинтез отдельных аминокислот. Именно поэтому создание культур, устойчивых к гербицидам, стало одной из самых актуальных задач.

Устойчивость к гербицидам можно создать тремя разными путями:

- обеспечить высокий уровень синтеза белка-мишени (чувствительного к гербициду), чтобы его хватало для полноценного функционирования в присутствии гербицида;
- уменьшить способность белка-мишени к связыванию с гербицидом;
- обеспечить инактивацию гербицида в растении.

Таблица 6.

Примеры генетически обусловленной устойчивости к гербицидам

Гербицид	Способ приобретения устойчивости	Растение
Глифосат (Roundup®)	Введение гена 5-еноил-пирувилшикимат-3-фосфат - синтазы (EPSPS) из <i>A. tumefaciens</i> или устойчивой разновидности кукурузы, обеспечивает синтез нечувствительного фермента. Введение гена глифосатоксиредуктазы (gox) из <i>Ochrobactrum anthropi</i> , дает возможность разрушать гербицид.	Соя, канола, хлопчатник, кукуруза, сахарная свекла
Глюфосинат (Basta®, Liberty®)	Введение гена <i>bar</i> из <i>Streptomyces hygroscopicus</i> или <i>pat</i> из <i>S. viridochromogenes</i> , кодирующего фосфинотрицинацетилтрансферазу, обеспечивает детоксикацию гербицида.	Соя, канола, цикорий, хлопчатник, кукуруза, рис, сахарная свекла
Бромоксинил	Введение гена нитриказы из <i>Klebsiella ozaenae</i> обеспечивает детоксикацию гербицида.	Хлопчатник, канола, табак
Хлорсульфурон	Устойчивость достигается введением в растительный геном генов, кодирующих устойчивые формы ацетолататсинтазы - белка-мишени гербицида.	Кукуруза, рис

Устойчивость к патогенам

В настоящее время существует несколько стратегий получения генетически модифицированных растений, устойчивых к вредителям различной природы. К их числу этих стратегий относятся:

- введение в растение генов ингибиторов протеиназ; модификация вторичных метаболитов растений;
- регуляция защитного ответа (тканеспецифическая экспрессия различных ферментов).
- введение генов специфических белковых токсинов (эндотоксины *Bacillus thuringensis* (*Bt*));
- синтез растениями протеолитических ферментов (хитиназа,  $\beta$ -1,3-глюканаза), гидролизующих соединения, входящие в состав клеточной стенки грибов.

Большинство работ по созданию трансгенных культур, устойчивых к вредителям, осуществлено с использованием генов эндотоксина *B. thuringensis*.

***B. thuringensis*** - почвенная спорообразующая бактерия. Описанные на сегодняшний день штаммы *Bt* демонстрируют специфическую инсектицидную активность по отношению к представителям нескольких систематических групп насекомых.

Спектр активности этих штаммов определяется структурой кристаллических белковых токсинов (Cry-proteins), находящихся в составе бактериальных спор. Всего у штаммов *Bt*, принадлежащих к различным серотипам, описано около 20 генов Cry-белков. В кишечнике чувствительных (к данному токсину) насекомых протоксин подвергается гидролизу протеазами и, тем самым, образуется активированный истинный токсин. Взаимодействуя с рецепторами на поверхности клеток эпителия кишечника, токсин продуцирует поры в

клеточной мембране, из-за чего нарушается осмотическое равновесие, клетки лизируются и насекомое гибнет. Однако многие вредители, в частности личинки кукурузного мотылька, питаются внутренними тканями растения, поэтому препараты *Bt*, распыляемые на поверхность растений, оказываются малоэффективны.

В последние годы основными культурами, трансформированными генами *Cry*- белков, стали картофель, кукуруза, и хлопчатник. С 1996 года в США было начато культивирование *Bt*-сортов этих видов растений на промышленной основе.

Таблица 7.

**Примеры экспрессии генов *BE* токсинов в трансгенных растениях**

Насекомое-вредитель	Растение	Ген
Кукурузный мотылек	Кукуруза	<i>cry1A (b)</i> , <i>cry1A(c)</i> , <i>cry3b1</i>
Хлопковый долгоносик	Хлопчатник	<i>cry 1A (c)</i>
Колорадский жук	Картофель	<i>cry3A</i>
Чешуекрылые насекомые	Томат	<i>cry1A(c)</i>

**Устойчивость к вирусам**

В основе получения вирусоустойчивых трансгенных культур лежит метод создания «перекрестной защиты», когда приобретение устойчивости к вирусному патогену достигается за счет экспрессии в растительной клетке фрагментов вирусного генома, в частности генов, кодирующих один из нескольких белков оболочки вируса. Если в трансгенном растении экспрессируется ген, кодирующий белок оболочки вируса, который обычно инфицирует это растение, то способность вируса проникать в растение и распространяться в нем значительно уменьшается.

Таблица 8.

**Примеры генетически обусловленной устойчивости к фитовирусам**

Растение	Вирус- источник генов
Папая	Вирус кольцевой пятнистости папай (PRSV)
Картофель	Вирус Y картофеля; вирус скручивания листьев картофеля (PLRV)
Тыква	Вирус мозаики огурца (CMV), вирус желтой мозаики цуккини (ZYMV) и вирус мозаики арбуза (WMV)

Защита растений от патогенных вирусов и грибковых инфекций может осуществляться также при участии защитных белков растительного происхождения, гены которых вводятся в растения. К их числу относятся, например, противовирусные белки или ингибиторы протеиназ, которые, попадая в кишечник насекомого, блокируют гидролиз растительных белков.

**Трансгенные растения с комбинированной устойчивостью и признаком мужской стерильности**

В последние годы наблюдается рост посевных площадей, занимаемых растениями, с так называемой, комбинированной устойчивостью, сочетающими два трансгенных признака. Так, например, создана трансгенная линия картофеля, содержащие гены *Bt*-токсина и

устойчивости к вирусу скручивания листьев; кукуруза, экспрессирующая гены устойчивости к глифосату или фосфинотицину наряду с геном Vt-токсина и т.п.

Получившие широкое распространение трансгенные разновидности культурных растений с признаком мужской стерильности содержат, в дополнение к генам устойчивости, ген рибонуклеазы *барназы* из *Bacillus amyloliquefaciens*.

Экспрессия данного гена в клетках пыльников вызывает стерильность пыльцы. Благодаря этому, трансгенный признак устойчивости не может распространяться через перекрестное опыление в природных популяциях растений-близких родственников трансгенного сорта. Для получения жизнеспособных семян, трансгенную линию, содержащую ген барназы, скрещивают с другой линией, содержащей ген природного ингибитора рибонуклеазы - *барстара*.

## Растения с улучшенными потребительскими качествами

Генноинженерные методы не только позволяют ускорить процесс получения растений с улучшенными свойствами, но и создавать сорта с совершенно новыми признаками, которые было бы невозможно создать передать растениям при помощи традиционных методов скрещивания.

Преждевременное созревание плодов является серьезной проблемой при транспортировке продукции. Известно, что в процессе созревания и размягчения активируются гены, кодирующие ферменты *целлюлазу* и *полигалактоуридазу*.

Подавление экспрессии одного из этих генов приводит к отсрочке созревания плодов. Второй путь замедления созревания плодов - ингибирование экспрессии генов, кодирующих ключевые этапы биосинтеза растительного гормона этилена, который играет важную роль в процессе старения растения. Ингибирование экспрессии определенного гена достигается путем введения в геном растения дополнительной копии этого гена в **антисмысловой ориентации** (обратной по отношению к промотору). С использованием этих технологий созданы коммерческие сорта томатов с замедленным созреванием плодов, а также гвоздики, способные долго сохранять свежесть после срезания.

## Изменение пищевой ценности растений

К числу самых успешных в этой области относятся работы по созданию растений с измененным составом жирных кислот. Трансгенные растения канолы (рапса) и сои с повышенным содержанием олеиновой и лауриновой кислот были получены путем регуляции экспрессии в растениях генов ферментов, определяющих длину цепи и степень насыщенности жирной кислоты.

Активно ведутся работы по созданию трансгенных растений с измененным аминокислотным составом запасующих белков семян (например, с увеличенным содержанием лизина), с улучшенными вкусовыми качествами (примером могут служить работы по получению плодовых и ягодных культур, трансформированных геном сладкого белка *тауматина*), а также растений, синтезирующих предшественник витамина А (к ним относится созданный несколько лет назад "золотой рис").

## Изменение окраски цветков

Для выведения цветов с необычной окраской можно использовать методы, основанные на манипуляциях с генами ферментов, участвующих в процессе биосинтеза антоцианов. Эти соединения, относящиеся к классу флавоноидов, являются наиболее распространенными пигментами цветков. Ингибирование экспрессии генов, ответственных за определенные стадии синтеза окрашенных соединений флавоноидного ряда или введение

новых генов растительного происхождения, позволяет получать растения с совершенно новой окраски, ранее не встречавшейся ни у одного сорта данного вида.

## Использование трансгенных растений для производства белков терапевтического назначения

Растения считаются очень перспективной системой для получения белков не растительного происхождения, поскольку обладают рядом значительных преимуществ по сравнению с клеточными культурами прокариот, дрожжей и млекопитающих. Клетки растений способны к правильной сборке и посттрансляционной модификации сложных белковых молекул. Применение специфических промоторов делает возможным накопление целевого белка в запасующих органах и тканях растений. Для производства белков терапевтического назначения в условиях *in vitro* могут быть также использованы суспензионные культуры растительных клеток и культуры косматых корней (*hairy root*).

В настоящее время получены растения-продуценты таких важных для медицины белков, как энкефалины,  $\alpha$ -интерферон, человеческий сывороточный альбумин, фактор, стимулирующий образование колоний макрофагов и гранулоцитов. Получены трансгенные растения табака и картофеля, шпината, банана, синтезирующие белки различных патогенных вирусов (гепатита В, бешенства, Norwalk и др.), которые могут быть использованы в качестве «съедобных вакцин».

Кроме того, получены растения, синтезирующие различные иммуноглобулины (антитела), которые имеют большую ценность для диагностики и терапии серьезных заболеваний (в частности, некоторых форм рака).

## 5.4 Трансгенные животные

Эксперименты по генетической модификации животных требуют значительных затрат времени. Тем не менее, трансгеноз стал мощным инструментом для исследования молекулярных основ экспрессии генов млекопитающих и создания модельных систем, позволяющих изучать болезни человека.

Введение чужеродной ДНК в животные клетки можно осуществить либо физическими методами (микроинъекция, электропорация, слияние липосом), либо при помощи вирусных векторов.

Для изучения экспрессии перенесенных генов в лабораторных условиях используют животные клетки, выращенные в культуре.

Первичные клеточные культуры, полученные из свежих тканей, обычно имеют ограниченное время жизни. Однако из таких культур можно получить *перевиваемые клеточные линии*, клетки которых, по существу, бессмертны. Такие линии, полученные из эмбрионов грызунов, почек и опухолей обезьян и человека, широко используются в экспериментах с рекомбинантной ДНК.

Стратегия получения трансгенных животных состоит в следующем:

1. клонированный ген в составе вектора вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки;
2. инокулированные оплодотворенные яйцеклетки имплантируют в реципиентную женскую особь;
3. отбирают потомков, которые содержат клонированный ген во всех клетках;
4. скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

**Клонирование трансгенных животных** можно производить путем переноса ядра из соматической клетки в половую, и ее последующей имплантации в «суррогатную мать».

**Перспективы применения трансгенных животных:** Кроме создания новых пород крупного рогатого скота с улучшенными ростовыми характеристиками и повышенной устойчивостью к болезням, можно использования животных в качестве «биофабрик» для получения терапевтически важных белков, секретируемых в молоко. К числу таких белков относятся: лактоферрин, интерлейкины, урокиназа.

## 5.5 Рекомбинантные микроорганизмы

Рекомбинантные штаммы бактерий и дрожжей широко используют для микробиологического синтеза белков, витаминов, аминокислот, антибиотиков и других ценных соединений. Методами генной инженерии можно усиливать природную способность определенных видов бактерий к осуществлению специфических биологических процессов и создавать высокоэффективные штаммы микроорганизмов, осуществляющие разрушение токсичных субстратов или способствующие росту культурных растений. Большой интерес представляет производство в клетках микроорганизмов белков терапевтического назначения. С этой целью кДНК, несущую информацию о структуре нужного белка, клонируют в экспрессирующем прокариотическом векторе. Это позволяет достичь высокого уровня экспрессии. Объектами трансгенных технологий являются не только *E. coli*, но и бактерии родов *Bacillus*, *Erwinia*, *Streptomyces* и др., а также культуры дрожжей и других микроскопических грибов. Приведем примеры использования рекомбинантных микроорганизмов и продуктов микробного синтеза в различных областях.

- **Медицина** - Производство инсулина, интерлейкинов, интерферона, гормона роста, эритропоэтина, ДНКазы, альгинатлиазы, иммуноглобулинов, рекомбинантных вакцин.

- **Производство ферментов и малых биологических молекул** - Эндонуклеазы рестрикции и др. ферменты для исследовательских нужд. Химозин. Аминокислоты (лизин, триптофан и др.), индиго, L-аскорбиновая кислота. Антибиотики.

- **Биодеградация отходов** - Утилизация целлюлозы, ароматических соединений, производство этанола.

- **Сельское хозяйство** - Микробные инсектициды, микробные удобрения, производство стимуляторов роста растений.

## 5.6 Проблемы безопасности трансгенных организмов

Наряду с оптимистическими надеждами на большую выгоду от применения трансгенных технологий существуют и серьезные опасения, что генетически модифицированные организмы потенциально могут быть опасными для человека и среды его обитания.

Например, к числу экологических проблем, связанных с внедрением в сельскохозяйственную практику генетически модифицированных растений относят:

-возможность неконтролируемого распространения трансгенов в природных популяциях дикорастущих видов растений;

-возможность негативного действия трансгенных растений, содержащих гены устойчивости, на нецелевые организмы;

-возможность быстрого возникновения устойчивых форм сорняков и насекомых-вредителей и др.

Наряду с экологическими проблемами рассматриваются:

-возможность незапланированного изменения метаболизма трансгенной клетки; - возможность изменения эпидемических характеристик рекомбинантных микроорганизмов;

-проблема изменения аллергенного потенциала трансгенных организмов;

-проблемы, связанные с использованием при конструировании трансгенных организмов селективных генов и др.

Обеспокоенность общественности по поводу создания различных организмов методами геной инженерии привела к разработке строгих правил, регулирующих исследования в области рекомбинантных ДНК, и утверждению требований, которым должны удовлетворять биотехнологические продукты, поступающие на рынок и трансгенные организмы, выпускаемые в окружающую среду.

## Литература

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир. 2000.
2. Дейпер Дж., Скотт Р. и соавт. Генная инженерия растений: Лабораторное руководство. М.: Мир. 1991.
3. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М.: Мир. 1998.
4. Сельскохозяйственная биотехнология. Под ред. акад. РАСХН В.С. Шевелухи. М.: Высшая школа. 2003.
5. Bakshi A. (2003) Potential adverse health effects of genetically modified crops. *J. Toxic Environ Health*. Part.B. 6: 221-225.
6. Sasson A. Plant biotechnology - derived products: market-value estimates and public acceptance// IX International congress on plant tissue and cell culture (International Association for Plant Tissue Culture, IAPTC, Jerusalem, Israel, 14-19 June,1998).  
<http://www.agbios.com>; <http://www.isaaa.org/>; <http://www.isb.vt.edu/>;  
<http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/TransgenicCrops/>

## 6. Методы анализа ГМИ в пищевых продуктах и растительном сырье

Активное применение генетически модифицированных растений в агропромышленном производстве, необходимость контроля за соблюдением правовых норм, регламентирующих применение и распространение ГМИ потребовали развития методов идентификации ГМ-составляющих в растительном сырье и готовых пищевых продуктах. За последние годы разработано достаточно много систем анализа, которые основаны на "классических" молекулярно-биологических и биохимических методах и адаптированы к проведению массового скрининга. Любой анализ такого рода основывается на поиске различия между генетически модифицированным образцом и его немодифицированным аналогом.

Первая группа методов направлена на определение последовательностей, перенесенных в геном растения, при помощи их амплификации в ходе ПЦР с последующей детекцией. Методы второй группы основаны на иммунодетекции рекомбинантного белка, синтезируемого трансгенным растением. Благодаря большому разнообразию подходов, стало возможным подобрать методику наиболее точно соответствующую целям данного исследования и провести простое определение, идентификацию или количественную оценку содержания ГМ-составляющих (Табл.10).

Таблица 9

**Сравнительная характеристика основных методов анализа ГМИ в пищевых продуктах и растительном сырье**

ПЦР	ИФА
Позволяет определить не только факт генетической модификации, но и ее разновидность и различать трансгенные линии между собой.	Позволяет установить наличие признака, характерного для определенной группы ГМО (например, одного Сгу-белков или EPSPS), но не пригоден для идентификации отдельных линий.
Более чувствительный метод. Относительно дешевый, но требует серьезной подготовки персонала. Из-за высокой чувствительности метода существует опасность появления ложноположительных результатов.	Более специфичный, но, вместе с тем, и более дорогой метод. Разработка и оптимизация анализа (включая получение антител) занимает достаточно длительное время. Проведение анализа становится невозможным в случае а)использования для создания ГМ-сорта антисенс-технологии; б)стадиеспецифической экспрессии трансгена; или в)деградации белка при термической обработке пищевых продуктов.
Позволяет проводить оценку количественного содержания ГМ-сырья (ПЦР в реальном времени) и одновременно анализировать несколько мишеней (мультипраймерный ПЦР).	Позволяет проводить оценку содержания ГМ-сырья количественно и полуколичественно.

Необходима информация о структуре генетических последовательностей, использовавшихся для получения трансгенного сорта.	Возможность получения антител зависит от природы белка (его антигенных свойств) и коммерческой доступности самого белка.
Порог чувствительности метода ок. 0.01% ГМИ, однако для точной количественной оценки необходимо работать в диапазоне концентраций выше 0.1%	Порог чувствительности метода ок. 0.1%

В настоящее время наибольшее распространение получили методы, основанные на **ПЦР амплификации** трансгенных последовательностей. В качестве амплифицируемых последовательностей при таком анализе в основном используются последовательности промотора 35SCaMV (который встречается в составе 75% генетических конструкций, используемых для создания ГМ культур), а также *nos*-промотора и терминатора (*polyAnos*). В качестве мишеней для ПЦР-анализа также могут быть использованы последовательности селективных и маркерных генов (например, *gus* и *nptII*) (Табл.10).

Однако использование в качестве последовательностей-мишеней только таких элементов как промоторы или терминаторы, либо генов селективных маркеров, не может дать полноценной информации о природе генетической модификации. Кроме того, амплификация последовательностей пр. 35SCaMV и *polyAnos* может приводить к появлению ложноположительных сигналов из-за контаминации растительного материала вирусами или бактериями из геномов которых клонированы эти генетические элементы. Таким образом, эти довольно распространенные последовательности лучше всего подходят в качестве мишеней для проведения массового скрининга.

Использование для детекции последовательностей целевых генов, помогает провести более точный качественный и количественный анализ. В их число входят гены ферментов, определяющих устойчивость к гербицидам: EPSPS, и *pat (bar)*, а также гены Вt-токсинов (например, *cry3a*, *cryIAb*), специфичных для определенного ГМ-сорта). Понятно, что спектр анализируемых последовательностей будет расширяться по мере появления на рынке трансгенных сортов с новыми признаками.

Перечисленные мишени используются в коммерческих ПЦР- тестах следующих фирм: **AgroGene, France; Biogenetic Services, USA; Promega, USA; GeneScan, Europe, Germany**, а также в стандартной методике, принятой для определения разрешенных в ЕС трансгенных сортов, разработанной European Union's Joint Research Center, JRC.

Таблица 10

**Некоторые генетически-модифицированные сорта, культивируемые в промышленных масштабах.**

Трансгенный сорт, производитель	Целевой ген(ы), промотор/терминатор	Селективный маркер, промотор/ терминатор
Кукуруза <b>GA21</b> Roundup Ready® Monsanto Company	<b>mEPSPS</b> , пр. и инт. актина риса, терм. <i>nos</i> , хлоропластный транзитный пептид RUBISCO, терм. <i>nos</i>	

Трансгенный сорт, производитель	Целевой ген(ы), промотор/терминатор	Селективный маркер, промотор/ терминатор
<b>Кукуруза 176</b> NaturGard™ KnockOut™ Syngenta Seeds, Inc	<b>cry1Ab</b> первая копия - пр.фосфоенолпируваткарбоксилазы вторая копия - пр. кальций- зависимой протеинкиназы кукурузы; у обеих терм.35CaMV <b>bar</b> пр.35CaMV, терм.35CaMV	<b>bla</b> под бакт. промотором, усечен, не работает в растениях
<b>Кукуруза T25/14</b> Liberty-Link™ Bayer CropScience (Aventis CropScience(AgrEvo))	<b>pat</b> пр.35CaMV, терм. 35CaMV	<b>bla</b> под бакт. промотором, усечен, не работает в растениях
<b>Кукуруза Bt11</b> Syngenta Seeds, Inc.	<b>cry1Ab</b> инт. IVS6 (алкогольдегидрогеназы кукурузы), пр.35CaMV, терм, nos	<b>pat</b> (неполный) инт. IVS6, пр.35CaMV, терм, nos
<b>Кукуруза MON810</b> Yieldgard® Monsanto Company	<b>cry1Ab (3'-конец усечен)</b> пр.35CaMV, инт. HSP70, терм, nos	<b>npt II</b> под бакт. промотором
<b>Соя A2704-12</b> Aventis CropScience	<b>pat</b> пр.35CaMV, терм. 35CaMV	
<b>Соя GTS 40-3-2</b> Roundup Ready® Monsanto Company	<b>CP4EPSPS</b> пр. E35CaMV, хлоропластный транзит, пептид из петунии, терм.nos	
<b>Картофель BT6, BT10, BT12, BT16, BT17, BT18 BT23</b> NewLeaf™ На основе сорта Russet Burbank Monsanto	<b>cry 3A</b> (модиф., усечен 5' конец), пр. E35CaMV, терм. rbcS Линии различаются количеством копий целевого гена	<b>npt II</b> , пр.35CaMV, терм.nos
<b>Рис LLRICE06</b> Liberty-Link™ Aventis CropScience	<b>bar</b> пр.35CaMV, терм.35CaMV	
<b>Сахарная свекла T120-7</b> Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	<b>pat</b> пр.35CaMV, терм.35CaMV	<b>npt II</b> , пр. nos

Трансгенный сорт, производитель	Целевой ген(ы), промотор/терминатор	Селективный маркер, промотор/терминатор
Рапс GT73 Westar Roundup Ready® Monsanto Company	CP4 EPSPS пр.35SFMV (вируса мозаики норичника), хлоропластный лидер СТР 2, терм. E9 3' (rbcS малой субъед. RUBISCO гороха) goxv247 (глифосат оксиредуктаза) пр.35SFMV, хлоропластный лидер СТР 1, терм. E9 3'	

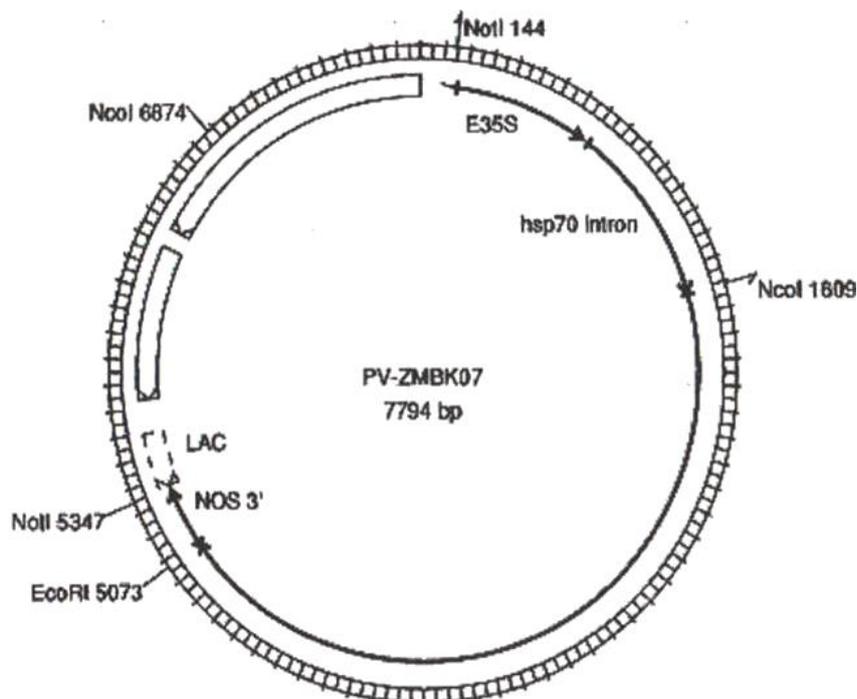
**Сокращения:** пр.-промотор; терм. - терминатор; инт. - интрон.

**Примечание:** с полной базой данных генетически-модифицированных сортов культурных растений можно ознакомиться на веб-сайте [www.agbios.com](http://www.agbios.com)

В некоторых странах Евросоюза реализуется схема последовательной детекции, включающая на первом этапе анализ присутствия ГМ-сырья (пр. 35SCaMV и polyAnos), и на втором - установление природы генетической модификации (детекция целевого гена). Это позволяет максимально точно определить, с ГМИ какого типа - разрешенным или запрещенными - имеет дело исследователь.

Для идентификации отдельных трансгенных линий конструируют праймеры к регионам, соединяющим отдельные элементы генетических конструкций (например, промотор, интрон и ген) (рис. 6.1).

Кроме того, для установления видовой принадлежности ГМ- растения в качестве амплифицируемых в ходе ПЦР, используют последовательности генов запасующих белков семян (например, *зеина* - для кукурузы и *лектина* для сои). Амплификация этих последовательностей также служит внутренним контролем качества прохождения реакции и выделения ДНК для ПЦР.



**Рис.6.1.** Схема рекомбинантной плазмиды, использовавшейся для получения трансгенного сорта кукурузы (MON 810).

Идентификация ПЦР-продуктов (ампликонов) может проводиться как после амплификации, при помощи электрофореза или гибридизации на чипах, так и в режиме реального времени (RealTime PCR). Проведение рестрикционного анализа или гибридизации ампликонов со специфическими последовательностями обеспечивает увеличение специфичности анализа (подробно см. главу «Технология генных чипов»). Увеличение специфичности может быть также достигнуто за счет проведения ПЦР в два тура с использованием праймеров к разным участкам генетической конструкции (сначала к внешним, потом - к внутренним (*nested PCR*)).

Возможность применения традиционного ПЦР-метода для количественного определения ГМИ ограничена из-за нелинейного характера накопления амплифицированного продукта и плохой воспроизводимости такого измерения. Для полуколичественного определения может быть использован так называемый *конкурентный метод проведения ПЦР (competitive PCR)*. Метод основан на проведении совместной амплификации исследуемой ДНК и стандартных образцов известной концентрации, имеющих в своем составе анализируемые последовательности. Предполагая, что эффективность амплификации анализируемого образца и стандарта одинакова, концентрации ампликонов можно сравнить при помощи обычного электрофореза. Однако данный метод также имеет определенные ограничения.

Проведение ПЦР в режиме реального времени (подробно см. главу «ПЦР») дает возможность проведения наиболее точной количественной оценки содержания исследуемой ДНК в образце. Результаты Real time PCR могут быть оценены двумя способами. Во-первых, путем анализа калибровочных кривых, связывающих начальное количество молекул ДНК мишени с номером цикла амплификации, при котором сигнал достигает детектируемого значения ( $C_t$ ). В другом случае в исследуемый образец добавляют ДНК контрольного гена в известной концентрации. Затем отдельно проводят параллельные реакции амплификации с праймерами для контрольного гена и гена мишени. Таким образом, если в образец исследуемой ДНК внести препарат контрольного гена в количестве соответствующему предельному допустимому уровню (например, 0.9%), то формула, приводимая ниже, легко позволит определить превышение допустимого содержания примесей.

$$T = N^{(C_t \text{ contro1} - C_t \text{ target})} \times 100\%$$

T - количество ДНК гена мишени в процентах от предельно допустимого уровня.

N - коэффициент амплификации (обычно равен 2).

$C_t$  control - номер цикла амплификации при котором контрольный ген достигает детектируемой величины.

$C_t$  target - номер цикла амплификации при котором ген-мишень достигает детектируемой величины.

Применение **методов иммуноферментного анализа (ИФА или ELISA)** делает возможным определение белка (антигена), кодируемого перенесенным геном в белковых экстрактах семян, растительных тканей и др. сырья. Для идентификации антигена используют специально получаемые для этих целей поли- или моноклональные антитела, специфичные к этому белку. Первые антитела распознаются вторыми, которые предварительно связываются с маркерными молекулами, ферментами - пероксидазой или щелочной фосфатазой. Активность фермента-маркера выявляется при помощи окрашенного субстрата (**рис.6.1**). По интенсивности поглощения света определенной длины волны судят об эффективности связывания аналитических антител с антигеном.

Для получения калибровочной кривой используют различные разведения очищенного белка (поставляется вместе с набором для ИФА). Для повышения чувствительности метода могут быть использованы антитела, меченые стрептавидином, к которым добавляют биотин, связанный с ферментом-маркером. Иммуноферментный анализ может проводиться как в

формате стандартных 96-луночных тест-планшетов (**Biodiagnostics**, USA; **Biogenetic Services**, USA; **GeneScan**, Europe, Germany; **EnviroLogix**, USA), так и при помощи тест-полосок с иммобилизованными антителами (**STA laboratories**, USA; **Strategic Diagnostics**, USA; **EnviroLogix**, USA).

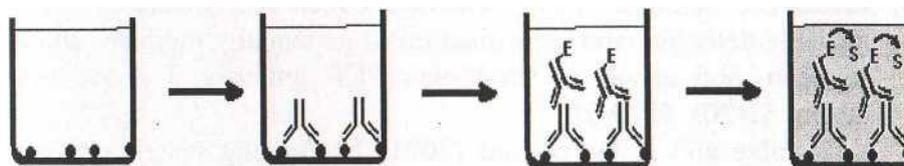


Рис. 6.2. Принцип иммунодетекции рекомбинантного белка.

Важным моментом для разработки, оптимизации и стандартизации того или иного метода является доступность *сертифицированных референсных материалов (certified reference materials - CRM)*, содержащих анализируемые генетические последовательности (или белки) в заранее известных концентрациях. На сегодняшний день основным разработчиком этого вида стандартов является Institute for Reference Materials and Measurements, Belgium (<http://www.irmm.jrc.be/>).

## Литература

1. Matsuoka T., Kuribara H., Akiyama H., Miura H., Goda Y., Kusakabe Y., Isshiki K., Toyoda M., and Hino A. (2001) multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *J. Food hyg. Soc. Japan.* 42(1): 24-32.
2. Lubec M. Detection of genetically modified plants - methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products. <http://www.skovognatur.dk>
3. Rott M.E., Lawrence T.S., Wall E.M., Green M.J. (2004) Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem.* 52(16): 5223-32.
4. James D., Schmidt A.M., Wall E., Green M., Masri S. (2003) Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *J Agric Food Chem.* 51(20): 5829-34.
5. A. Schulze and J. Downward (2001) Navigating gene expression using microarray - a technology review. *Nature cell biology* V.3.
6. D. Rose and M. Faughn (1999) DNA microarray handbook Experimental protocols and instrumentation. Version 3. Cartesian Technologies, Inc.
7. J. Sambrook et al., Molecular cloning A laboratory manual Third Edition. A10.1, v.3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
8. M. Gabing and G. Wegrzyn (2001) An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. *Acta Biochimica Polonica.* 48 (3): 615-622.
9. Vernon S.D, Farkas D.H, Unger E.R, Chan V., Miller D.L., Chen Y.P., Blackburn G.F., Reeves W.C. (2003) Bioelectronic DNA detection of human papillomaviruses using eSensor: a model system for detection of multiple pathogens. *BMC Infect Dis.* 19(3): 12.

<http://gmotraining.jrc.it/>

<http://www.irmm.jrc.be/>

[www.agbios.com](http://www.agbios.com)

## ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ И КОНТРОЛЯ

### 1

1. Опишите структуру ДНК. В чем отличия ДНК и РНК?
2. Виды РНК. В чем отличия и каковы их функции?
3. Опишите различия между про- и эукариотами в строении и экспрессии генов.

### 2

1. Какие основные этапы выделения ДНК. Назовите основные методы очистки нуклеиновых кислот.
2. Назовите методы количественного определения ДНК и чем они отличаются.

### 3

1. Что такое ПЦР и в чем принцип метода?
2. Какие реактивы необходимы для проведения ПЦР?
3. Опишите этапы ПЦР, анализ продуктов амплификации. В чем отличия ассиметричной ПЦР?

### 4

1. Что такое микроэрей? Опишите основные типы микроэрееев.
2. Опишите этапы конструирования генного чипа.
3. В чем заключается процесс печати генных чипов и какие основные различия в методах их печати?
4. Опишите процесс гибридизации генного чипа.
5. Для чего применяются генные чипы?

### 5

1. В чем заключается технология рекомбинантных ДНК? Опишите процесс переноса генов.
2. Встраивание переносимого гена в вектор. Какие существуют типы векторов, для чего они применяются и чем отличаются?
3. Опишите основные методы анализа генетически-модифицированных организмов.
4. В чем особенности переноса генов в растительные клетки?
5. Опишите основные принципы конструирования векторов для трансформации растений.
6. Для чего применяются трансгенные растения? Значение трансгенных растений для человека.
7. Области применения рекомбинантных микроорганизмов.
8. Какие проблемы связаны с внедрением трансгенных организмов в сельском хозяйстве?

### 6

1. Назовите основные методы анализа ГМИ в пищевых продуктах. В чем их основные отличия?
2. В чем основные отличия между ПЦР и ИФА?

**Приложение.**  
**Межгосударственный стандарт ГОСТ 34150-2017**  
**"Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые.**  
**Метод идентификации генно-модифицированных организмов**  
**(ГМО) растительного происхождения с применением**  
**биологического микрочипа" (введен в действие приказом**  
**Федерального агентства по техническому регулированию и**  
**метрологии от 4 августа 2017 г. N 805-ст)**

Дата введения - 1 января 2019 г.

**Предисловие**

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0-2015 "Межгосударственная система стандартизации. Основные положения" и ГОСТ 1.2-2015 "Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены"

**Сведения о стандарте**

1 Разработан Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институтом физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН) и Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институтом молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

2 Внесен Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 Принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 1 июня 2017 г. N 51)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации	наименование органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики	Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт	Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт	Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт	
Россия	RU	Росстандарт	
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт	
Узбекистан	UZ	Узстандарт	
Украина	UA	Минэкономразвития	Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 4 августа 2017 г. N 805-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34150-2017 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2019 г.

5 Введен впервые

**1. Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на продукты растительного происхождения, готовые пищевые продукты с содержанием растительных компонентов (колбасы, пельмени,

молочные продукты и др.), пищевое сырье, посевной и посадочный материал, цветы (далее - продукт) и устанавливает метод идентификации генно-модифицированных организмов (ГМО) и генно-модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа.

Метод одновременно устанавливает наличие или отсутствие в анализируемой пробе не менее десяти различных трансгенных последовательностей ДНК. Чувствительность метода - не менее  $10^{-9}$  г (1 нг,  $\sim 10^3$  геном-эквивалентов тотальной растительной ДНК/1 мм<sup>3</sup> пробы).

## 2. Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

**ГОСТ 12.1.004-91** Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

**ГОСТ 12.1.005-88** Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

**ГОСТ 12.1.007-76** Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

**ГОСТ 12.1.019-79\*** Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

\* В Российской Федерации действует **ГОСТ Р 12.1.019-2009**.

**ГОСТ 12.4.009-83** Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

**ГОСТ 12.4.021-75** Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

**ГОСТ OIML R 76-1-2011** Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

**ГОСТ 1770-74** (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

**ГОСТ 3118-77** Кислота соляная. Технические условия

**ГОСТ 3164-78** Масло вазелиновое медицинское. Технические условия

**ГОСТ 4233-77** Натрий хлористый. Технические условия

**ГОСТ 4328-77** Натрия гидроокись. Технические условия

**ГОСТ 5962-2013** Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

**ГОСТ 6709-72** Вода дистиллированная. Технические условия

**ГОСТ 9284-75** Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

**ГОСТ 9805-84** Спирт изопропиловый. Технические условия

**ГОСТ 10652-73** Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N, N, N', N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б). Технические условия

**ГОСТ 12026-76** Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

**ГОСТ 20015-88** Хлороформ. Технические условия

**ГОСТ 21400-75** Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний

**ГОСТ 25336-82** Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26678-85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

**Примечание** - При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования - на **официальном сайте** Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю "Национальные стандарты", который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

### 3. Термины, определения и сокращения

#### 3.1 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 биологическая безопасность: Защищенность человека, общества и окружающей среды от негативного воздействия токсических, аллергенных, канцерогенных, мутагенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах.

3.1.2 генно-модифицированные источники; ГМИ: Сырье и пищевые продукты (компоненты), используемые человеком в натуральном или переработанном виде, полученные из генно-модифицированных организмов (ГМО) или содержащие их в своем составе.

3.1.3 генно-модифицированный организм; ГМО: Организм, генетический материал которого изменен с применением методов генной инженерии.

3.1.4 генная инженерия: Совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

3.1.5 биологический микрочип: Микроматрица с ячейками, в которых иммобилизован набор олигонуклеотидов.

3.1.6 праймер: Последовательность односторонней ДНК длиной до 25 нуклеотидов, применяемая для проведения асимметричной мультиплексной полимеразной цепной реакции.

3.1.7 асимметричная мультиплексная полимеразная цепная реакция; амПЦР: Полимеразная цепная реакция, где в одной пробирке с участием нескольких пар праймеров одновременно амплифицируются разные последовательности анализируемой ДНК, причем количество одного из праймеров каждой пары в несколько раз превышает количество другого праймера.

3.1.8 олигонуклеотид: Природное или синтетическое олигомерное соединение, состоящее из немногих остатков нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирной связью.

3.1.9 иммобилизованный олигонуклеотидный зонд: химически синтезированная одноцепочечная молекула ДНК, содержащая около 20 пар оснований, ковалентно закрепленная на каком-либо носителе.

3.1.10 генетическая детерминанта трансгенности: Генетические элементы, используемые в конструкциях, применяемых при создании ГМО (промоторы, терминаторы, репортерные гены и др.).

3.1.11 гибридизационная картина: Результат идентификации содержания генетических элементов обычных для генно-модифицированных организмов (ГМО) или полученных из них продуктов.

### 3.2 Сокращения

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;

дАТФ - дезоксиаденозинтрифосфат;

дГТФ - дезоксигуанозинтрифосфат;

дУТФ - дезоксиуридинтрифосфат;

дЦТФ - дезоксицитидинтрифосфат;

"ПР-1" и "ПР-2" - водные растворы праймеров.

## 4 Сущность метода

Метод основан на асимметричной мультиплексной полимеразной цепной реакции (амПЦР) с последующей гибридизацией продуктов этой амПЦР на биологическом микрочипе.

## 5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы

5.1 Универсальный аппаратно-программный комплекс (УАПК) для анализа биологических микрочипов с компьютерной программой для анализа полученных результатов.

5.2 Хлороформ по ГОСТ 20015, х.ч.

5.3 Амплификатор ДНК четырехканальный под микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,2 или 0,5 см<sup>3</sup> со следующими техническими характеристиками:

- число независимых термоблоков ... 4 шт;
- число пробирок по 0,5 см<sup>3</sup> в термоблоке ... 10 шт;
- рабочий объем реакционной смеси ... 10-50 мм<sup>3</sup>;
- диапазон регулирования температуры ... от 4 °С до 99 °С;
- точность поддержания температуры ...  $\pm 0,3$  °С;
- динамическая ошибка регулирования ...  $\pm 0,3$  °С;
- время выполнения цикла (92 °С - 1 с, 72 °С - 1 с) при 15 мм<sup>2</sup> ... 64 с;
- количество программ ... 28.

5.4 Термостат суховоздушный с рабочей температурой 37 °С, рабочий диапазон от 20 °С до 60 °С, обеспечивающий точность поддержания температуры  $\pm 1$  °С.

5.5 Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом допускаемой погрешности однократного взвешивания  $\pm 0,001$  г.

5.6 Камера морозильная по ГОСТ 26678, обеспечивающая температуру минус 20 °С.

5.7 Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

5.8 Микроцентрифуга настольная с частотой вращения ротора не менее 14000 мин<sup>-1</sup> с соответствующими адаптерами для пробирок.

5.9 Мешалка магнитная с подогревом.

5.10 Аппарат для встряхивания с частотой вращения не менее 1500 мин<sup>-1</sup>.

5.11 рН-метр любого типа в комплекте с комбинированным стеклянным электродом, погрешностью измерений  $\pm 0,1$  ед. рН.

5.12 Микродозаторы с переменным объемом дозирования:

- 0,5-10,0 мм<sup>3</sup> (шаг - 0,1 мм<sup>3</sup>, точность  $\pm$  2,5 %-10,0 %, воспроизводимость 3 %-7 %);
- 5,0-50,0 мм<sup>3</sup> (шаг - 0,5 мм<sup>3</sup>, точность  $\pm$  2,0 %-5,0 %, воспроизводимость 2,5 %-5 %);
- 20,0-200,0 мм<sup>3</sup> (шаг - 1,0 мм<sup>3</sup>, точность  $\pm$  1,5 %-2,0 %, воспроизводимость 2 %-3 %);
- 100-1000 мм<sup>3</sup> (шаг - 5 мм<sup>3</sup>, точность  $\pm$  1,0 %-1,5 %, воспроизводимость 1 %-2 %).

5.13 Штативы под микроцентрифужные пробирки на 30 и 80 шт.

5.14 Наконечники с фильтром для микродозаторов вместимостью 10, 20, 200 и 1000 мм<sup>3</sup>.

5.15 Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2, 0,5 и 1,5 см<sup>3</sup> стерильные.

5.16 Пестик или палочка стеклянные по ГОСТ 21400 для микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 см<sup>3</sup>.

5.17 Цилиндры стеклянные мерные лабораторные 1-25, 1-100, 1-250 и 1-1000 по ГОСТ 1770.

5.18 Колбы конические Кн-3-100-34, Кн-3-250-34 по ГОСТ 25336.

5.19 Колбы мерные 1-100, 1-250, 1-500 по ГОСТ 1770.

5.20 Емкость щелочеустойчивая пластиковая плотно закрывающаяся.

5.21 Пипетки стеклянные градуированные по ГОСТ 29227.

5.22 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

5.23 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

5.24 Кислота соляная концентрированная по ГОСТ 3118, х. ч.

5.25 Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

5.26 Этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль дигидрат (ЭДТА) по ГОСТ 10652, ч. д.а.

5.27 Трис(оксиметил)аминометан (ТРИС), массовой долей основного вещества не менее 98 %.

5.28 Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

5.29 Спирт изопропиловый по ГОСТ 9805, х. ч.

5.30 Масло вазелиновое по ГОСТ 3164.

5.31 Цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ), массовой долей основного вещества не менее 98 %.

5.32 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

5.33 Вода особо чистая стерильная, не содержащая ДНК, РНК и дезоксирибонуклеаз.

5.34 Фермент термостабильный HotTaq-полимераза для ПЦР с "горячим стартом" и оптимумом активности при температуре 70 °С-72 °С.

5.35 ПЦР буфер десятикратный (10х; 12,1 г в 1 дм<sup>3</sup> Трис-НСI, рН 8,8; 37,28 г в 1 дм<sup>3</sup> КСI, 5 % Твин-20, 50 % формаид; 142,83 мг в 1 дм<sup>3</sup> MgCl<sub>2</sub>).

5.36 Буфер гибридизационный.

5.37 Баня водяная, оснащенная терморегулятором, для поддержания и контроля температуры в диапазоне от 25 °С до 100 °С с погрешностью  $\pm$  2 °С.

5.38 Раствор водный дезоксирибонуклеозидтрифосфатов: дАТФ, дГТФ, дУТФ, дЦТФ с молярной концентрацией по 2 ммоль/дм<sup>3</sup> каждого.

5.39 Раствор флуоресцентного субстрата (ФС).

5.40 Раствор заведомо трансгенной ДНК (около 100 нг/мм<sup>3</sup> или 10<sup>6</sup> копий/мм<sup>3</sup>).

5.41 Раствор заведомо нетрансгенной ДНК (около 100 нг/мм<sup>3</sup> или 10<sup>6</sup> копий/мм<sup>3</sup>).

5.42 Раствор водный праймеров "ПР-1" для амплификации соответствующих участков генома, включающий следующие пары праймеров\*:

- праймеры для амплификации фрагмента гена RBCL, кодирующего большую субъединицу рибулозы-1,5-бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы (Асс. N Z95552, поз. 160-720);
- праймеры для амплификации фрагмента гена лектина LE1 (Асс. N K00821M30884, поз. 1080-1720);
- праймеры для амплификации фрагмента гена IVR1, кодирующего бета-фруктозидазу (Асс. N U16123, поз. 300-1090);
- праймеры для амплификации фрагмента 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (Асс. N FM177585, поз. 3560-3870);
- праймеры для амплификации фрагмента 35S-терминатора вируса мозаики цветной капусты (Асс. N FM177585, поз. 1260-1590);
- праймеры для амплификации фрагмента 35S-промотора каулимовируса мозаики норичника (FMV, Асс. N X06166, поз. 6260-6630);
- праймеры для амплификации фрагмента терминатора гена белка теплового шока пшеницы (Асс. N X58279, поз. 10-210);
- праймеры для амплификации фрагмента маркерного гена BAR, определяющего устойчивость к фосфинотрицину (Асс. N AY310901, поз. 380-920);
- праймеры для амплификации фрагмента терминатора pos из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*: (Асс. N FM177585, поз. 10-370).

5.43 Раствор водный праймеров "ПР-2" для амплификации соответствующих участков генома, включающий следующие пары праймеров\*:

- праймеры для амплификации фрагмента гена фосфорилазы УДФ-глюкозы (UDP-GP) (Асс. N D00667, поз. 50-310);
- праймеры для амплификации фрагмента гена фосфат-синтазы риса (SPS) (Асс. N U33175, поз. 5910-6250);
- праймеры для амплификации фрагмента маркерного гена nptII из транспозона Tn5 бактериального происхождения (Асс. N EU886197, поз. 9792-10145);
- праймеры для амплификации фрагмента терминатора ocs из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* (Асс. N AJ311872, поз. 5050-5240);
- праймеры для амплификации фрагмента терминатора гена RBCS гороха (Асс. N FM177582.1, поз. 5782-5920);
- праймеры для амплификации фрагмента промотора гена актина риса ACT1 (Асс. N S44221, поз. 12-380);
- праймеры для амплификации фрагмента маркерного гена gus из бактерии *Escherichia coli* (Асс. N EU503042, поз. 2770-3140).

Обозначение и назначение олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на биологическом микрочипе приведены в **таблице 1**.

Таблица 1

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Назначение олигонуклеотида
pDNA (rbcL)	ген RBCL	Зонд для идентификации ДНК растительного происхождения в анализируемой пробе
GM/ST1 (RBCL)	ген RBCL	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК сои и/или картофеля
ZM1 (RBCL)	ген RBCL	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК кукурузы
OS1 (RBCL)	ген RBCL	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК риса

ST1 <sub>2</sub> (RBCL)	ген RBCL	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК картофеля
GM2 (RBCL)	ген RBCL	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК сои
ZM/OS2 (RBCL)	ген RBCL	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК кукурузы и/или риса
ST2 (RBCL)	ген RBCL	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК картофеля
Le1 (Gm)	ген лектина (LE1)	Специфичный зонд для идентификации ДНК сои
Zein (Zm)	ген IVR1	Специфичный зонд для идентификации ДНК кукурузы
UDP-GP (St)	ген фосфорилазы УДФ-глюкозы	Специфичный зонд для идентификации ДНК картофеля
SPS (Os)	ген фосфат-синтазы риса	Специфичный зонд для идентификации ДНК риса
nptII	ген npt	Специфичный зонд для идентификации маркерного гена nptII из транспозона Tn5
35S <sub>p</sub> CAMV	промотор 35S	Специфичный зонд для идентификации 35S промотора вируса мозаики цветной капусты
35S <sub>p</sub> FMV	промотор FMV	Специфичный зонд для идентификации 35S FMV промотора каулимовируса мозаики норичника
Act1 <sub>p</sub>	ген актина ACT1	Специфичный зонд для идентификации промотора гена актина риса
Gus	ген gus	Специфичный зонд для идентификации маркерного гена gus
nos <sub>t</sub>	терминатор nos	Специфичный зонд для идентификации терминатора nos из агробактерии <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
35S <sub>t</sub> CAMV	терминатор 35S	Специфичный зонд для идентификации 35S терминатора вируса мозаики цветной капусты
rbcSt	Терминатор гена RBCS	Специфичный зонд для идентификации терминатора гена RBCS гороха
Ocs <sub>t</sub>	Терминатор Ocs	Специфичный зонд для идентификации терминатора ocs из агробактерии <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Bar	ген BAR	Специфичный зонд для идентификации маркерного гена BAR

#### 5.44 Описание биологического микрочипа

На рисунке 1 показана схема биологического микрочипа с иммобилизованными олигонуклеотидами, назначение которых приведено в таблице 1 (название олигонуклеотида соответствует изображенному на рисунке 1).

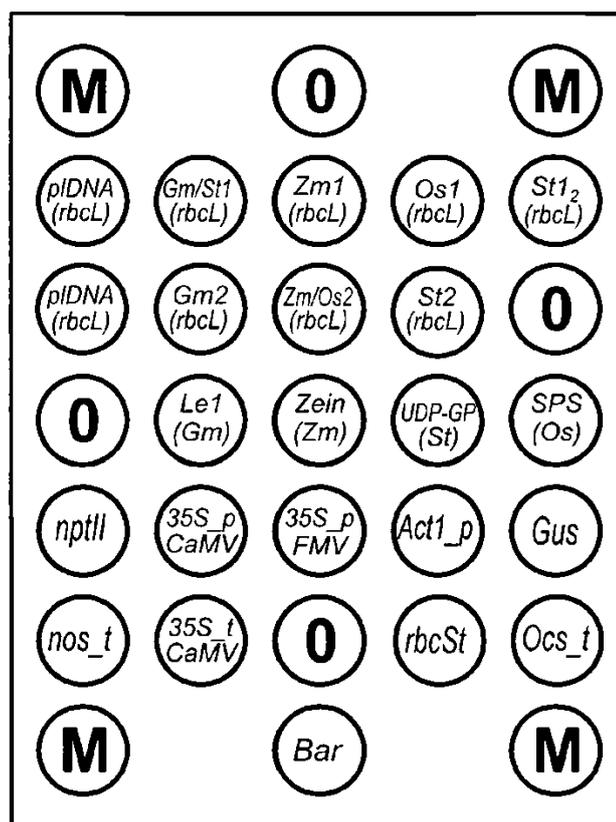


Рисунок 1 - Схема биологического микрочипа для идентификации генно-модифицированных источников растительного происхождения

Биологический микрочип представляет собой пластиковую подложку, выполненную по размерам предметного стекла по ГОСТ 9284, на поверхности которой в определенном порядке расположена 31 ячейка полиакриламидного геля в форме полусферы диаметром 100 мкм (обозначены кружками на рисунке 1).

22 из них содержат индивидуальный ковалентно иммобилизованный олигонуклеотид (перечень и назначение олигонуклеотидов приведены в таблице 1). Пять ячеек с индексом "O" не содержат перечисленных индивидуальных ковалентно иммобилизованных олигонуклеотидов и выполняют роль отрицательного контроля гибридизации. Четыре ячейки с индексом "M", содержат ковалентно связанный флуоресцентный краситель и предназначены для автоматического вычисления интенсивности флуоресценции ячеек биологического микрочипа после гибридизации.

Поверхность биологического микрочипа должна быть закрыта специальной составной крышкой с отверстиями, которая вместе с подложкой образует гибридизационную камеру, предназначенную для проведения реакции гибридизации анализируемых ПЦР-продуктов с иммобилизованными на биологическом микрочипе олигонуклеотидами, и исключающую возможность испарения реакционной смеси в процессе гибридизации.

Диагностическая специфичность при идентификации растительной ДНК сои, картофеля, кукурузы, риса составляет не менее 95 %.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также вспомогательного оборудования, посуды, реактивов и материалов с техническими характеристиками не хуже указанных выше.

## 6 Отбор проб

Отбор проб проводят по нормативным документам, действующим на территории стран, принявших стандарт и устанавливающих порядок отбора проб для однородных групп

продуктов (пищевого сырья, готовых пищевых продуктов с содержанием растительных компонентов, посевного и посадочного материала, цветов).

## 7 Подготовка к проведению анализа

### 7.1 Приготовление растворов

#### 7.1.1 Приготовление раствора NaOH концентрации 40 г/дм<sup>3</sup>

В стеклянную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 4,0 г сухой гидроокиси натрия по ГОСТ 4328 и растворяют в 100 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды (см. 5.30). После охлаждения раствора до комнатной температуры его переливают в специальную щелочеустойчивую пластиковую плотно закрывающуюся емкость.

Срок хранения при комнатной температуре - не более одного года.

#### 7.1.2 Приготовление раствора ЭДТА концентрации 74,4 г/дм<sup>3</sup>

В стеклянную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336 помещают 7,44 г ЭДТА (см. 5.26), растворяют в 80 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке. Затем раствором, приготовленным по 7.1.1 доводят pH раствора до 8,0 ед. pH. Полученный раствор переливают в мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см<sup>3</sup> и особо чистой стерильной водой доводят объем этого раствора до метки.

Срок хранения в холодильнике (см. 5.7) при температуре 4 °С-5 °С - не более 6 мес.

#### 7.1.3 Приготовление 70 %-ного раствора этилового спирта

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 200 см<sup>3</sup> вносят 140 см<sup>3</sup> 96 %-ного этилового спирта высокой степени очистки по ГОСТ 5962, добавляют 52 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды до метки и перемешивают.

Срок хранения в холодильнике при температуре 4 °С-5 °С - не более 6 мес.

#### 7.1.4 Приготовление раствора Трис-гидрохлорида массовой концентрации 242,2 г/дм<sup>3</sup>

В колбу по ГОСТ 25336 вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 24,22 г трис(оксиметил)аминометана (см. 5.27) и растворяют приблизительно в 80 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды. Концентрированной соляной кислотой по ГОСТ 3118 доводят pH раствора до 7,5 ед. pH, затем переливают в мерную колбу и доводят объем - до 100 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной водой.

Срок хранения при комнатной температуре - не более 6 мес.

#### 7.1.5 Приготовление раствора NaCl массовой концентрации 146,2 г/дм<sup>3</sup>

В колбу по ГОСТ 25336 вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 14,62 г хлористого натрия по ГОСТ 4233, растворяют в 70-80 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды, затем полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и особо чистой стерильной водой доводят объем раствора до метки.

Срок хранения при комнатной температуре - не более одного года.

#### 7.1.6 Приготовление ЦТАБ-буфера

В колбу по ГОСТ 25336 вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 2,0 г цетилтриметиламмониябромида (см. 5.31), добавляют 5 см<sup>3</sup> раствора Трис-HCl, приготовленного по 7.1.4, 56 см<sup>3</sup> раствора NaCl, приготовленного по 7.1.5, и 10 см<sup>3</sup> раствора ЭДТА, приготовленного по 7.1.2. Раствор переносят в мерную колбу и объем раствора доводят до 100 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной водой. Перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения соли.

Срок хранения при комнатной температуре - не более одного года.

#### 7.1.7 Приготовление ЦТАБ-раствора

В стеклянную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 0,5 г цетилтриметиламмониябромида (см. 5.31), добавляют 1,6 см<sup>3</sup> раствора NaCl, приготовленного по 7.1.5. Раствор переносят в мерную колбу и объем раствора доводят до 100 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной водой.

Срок хранения в холодильнике при температуре 4 °С-5 °С - не более одного месяца, в морозильной камере (см. 5.6) при температуре минус 20 °С - не более одного года.

#### 7.1.8 Приготовление разведенного раствора NaCl

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см<sup>3</sup> вносят 48 см<sup>3</sup> раствора NaCl, приготовленного по 7.1.5, доводят объем раствора до метки особо чистой стерильной водой.

Срок хранения при комнатной температуре - не более 6 мес.

7.1.9 Раствор Taq-полимеразы (см. 5.34) хранят при температуре минус 20 °С не более шести месяцев. Не допускается хранение раствора Taq-полимеразы ниже температуры минус 23 °С.

#### 7.2 Приготовление пробы для анализа (выделение ДНК)

7.2.1 Две параллельные пробы анализируемого продукта массой около 100 мг каждая помещают в две чистые стерильные микроцентрифужные пробирки (см. 5.15) вместимостью 1,5 см<sup>3</sup>, добавляют по 500 мм<sup>3</sup> ЦТАБ-буфера, приготовленного по 7.1.6, перемешивают на аппарате для встряхивания (см. 5.10) в течение 2 мин и выдерживают 15-20 мин при температуре 65 °С в термостате для микропробирок.

7.2.2 Микроцентрифужные пробирки со смесью, приготовленной по 7.2.1, центрифугируют при комнатной температуре в настольной центрифуге (см. 5.8) при частоте вращения 13000 мин<sup>-1</sup> в течение 10 мин.

7.2.3 Надосадочную жидкость, полученную по 7.2.2, отбирают микродозатором (обычно по 500 мм<sup>3</sup>) и переносят в чистые микроцентрифужные пробирки, добавляют равный объем хлороформа по ГОСТ 20015. Содержимое перемешивают на аппарате для встряхивания в течение 2 мин и центрифугируют 10 мин при частоте вращения 13000 мин<sup>-1</sup>.

7.2.4 Верхнюю жидкую фазу из смеси, полученной по 7.2.3, аккуратно отбирают микродозатором в чистые микроцентрифужные пробирки, не захватывая промежуточную или нижнюю фазу. В пробирки добавляют два объема ЦТАБ-раствора, приготовленного по 7.1.7, аккуратно перемешивают, переворачивая пробирки вручную, и выдерживают 60 мин при комнатной температуре.

7.2.5 Смесь, полученную по 7.2.4, центрифугируют 5 мин при частоте вращения 13000 мин<sup>-1</sup>. Надосадочную жидкость тщательно удаляют микродозатором, а осадок растворяют в 350-600 мм<sup>3</sup> (в зависимости от объема осадка) разведенного раствора NaCl, приготовленного по 7.1.8, добавляют равный объем хлороформа по ГОСТ 20015, перемешивают на аппарате для встряхивания в течение 30 с и центрифугируют 10 мин при частоте вращения 13000 мин<sup>-1</sup>.

7.2.6 Надосадочную жидкость, полученную по 7.2.5, отбирают микродозатором и переносят в чистые микроцентрифужные пробирки, добавляют равный объем изопропилового спирта (см. 5.29), аккуратно перемешивают содержимое пробирок вручную и выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре.

7.2.7 Смесь, полученную по 7.2.6, центрифугируют 10 мин при частоте вращения 13000 мин<sup>-1</sup>, надосадочную жидкость аккуратно сливают, а к осадку ДНК добавляют 1 см<sup>3</sup> 70 %-ного этилового спирта, приготовленного по 7.1.3 и охлажденного до температуры 0 °С-4 °С, перемешивают и центрифугируют 5 мин при частоте вращения 13000 мин<sup>-1</sup>.

7.2.8 Полученную надосадочную жидкость вновь тщательно удаляют, а осадок ДНК подсушивают при комнатной температуре до полного удаления этилового спирта, но не более 30 мин.

7.2.9 Осадок ДНК, полученный по 7.2.8, перерастворяют в 40-50 мм<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды. Полученный раствор ДНК используют для проведения амПЦР.

Срок хранения раствора ДНК в морозильной камере при температуре минус 20 °С - до одного года.

#### 7.3 Подготовка асимметричной мультиплексной ПЦР

##### 7.3.1 Приготовление реакционной смеси для амПЦР

7.3.1.1 Реакционную смесь для амПЦР готовят непосредственно перед анализом при температуре не выше 20 °С.

Готовят две микроцентрифужные пробирки вместимостью по 1,5 см<sup>3</sup> и маркируют их "М1" и "М2".

В пробирку "М1" микродозатором вносят (из расчета на каждую анализируемую пробу): 2,5 мм<sup>3</sup> 10х реакционного буфера для ПЦР (см. 5.35), 2,5 мм<sup>3</sup> смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (см. 5.38), 2 мм<sup>3</sup> фермента Таq-полимеразы (см. 5.34), концентрацией 5 Ед. акт/мм<sup>3</sup> (срок хранения Таq-полимеразы после разведения при температуре от 2 °С до 8 °С - не более 2 ч), 1 мм<sup>3</sup> флуоресцентного субстрата ФС (см. 5.39), а также 1 мм<sup>3</sup> водного раствора праймеров "ПР-1" (см. 5.42).

В пробирку "М2" микродозатором вносят (из расчета на каждую анализируемую пробу): 2,5 мм<sup>3</sup> 10х реакционного буфера для ПЦР (см. 5.35); 2,5 мм<sup>3</sup> смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (см. 5.38), 2 мм<sup>3</sup> фермента Таq-полимеразы (см. 5.34), концентрацией 5 Ед. акт/мм<sup>3</sup>, 1 мм<sup>3</sup> флуоресцентного субстрата ФС (см. 5.39), а также 1 мм<sup>3</sup> водного раствора праймеров "ПР-2" (см. 5.43).

Смесь разбавляют особо чистой стерильной водой до объема 20 мм<sup>3</sup> (из расчета на одну анализируемую пробу) и осторожно перемешивают в течение 3-5 с на аппарате для встряхивания, не допуская образования пены. Общий объем реакционных смесей в микропробирках "М1" и "М2" для амПЦР готовят с учетом числа анализируемых проб и двух контрольных проб: положительный контроль [заведомо трансгенная ДНК (см. 5.40)] и отрицательный контроль [заведомо нетрансгенная ДНК (см. 5.41)].

7.3.1.2 Реакционную смесь для амПЦР, полученную по 7.3.1.1, осаждают кратковременным (10-15 с) центрифугированием на настольной центрифуге при частоте вращения 1500-3000 мин<sup>-1</sup> и сразу же используют для проведения анализа.

7.3.2 Все этапы амПЦР должен проводить квалифицированный, специально обученный персонал. Для проведения амПЦР допускается использовать только стерильную лабораторную посуду и новые стерильные микроцентрифужные пробирки.

При проведении амПЦР каждую микроцентрифужную пробирку открывают только перед отбором или внесением анализируемой пробы, а по окончании манипуляции сразу же закрывают. Запрещается открывать одновременно несколько микроцентрифужных пробирок с анализируемыми пробами поставлять их открытыми длительное время. Каждую анализируемую пробу отбирают микродозатором с новым стерильным наконечником с фильтром.

## 8 Проведение анализа

### 8.1 Проведение асимметричной мультиплексной ПЦР

8.1.1 Для каждой анализируемой пробы готовят две чистых микроцентрифужных пробирки вместимостью 0,2 или 0,5 см<sup>3</sup>, маркируя их "N<sub>1</sub>" и "N<sub>2</sub>", где N - номер анализируемой пробы.

8.1.2 Реакционные смеси для амПЦР "М1" и "М2", полученные по 7.3.1.1-7.3.1.2, микродозатором вносят в микроцентрифужные пробирки по 20 мм<sup>3</sup> в каждую таким образом, чтобы смесь "М1" была распределена по пробиркам с индексом "N<sub>1</sub>", а смесь "М2" - по пробиркам с индексом "N<sub>2</sub>".

8.1.3 Анализируемую ДНК пробы N, выделенную по 7.2, вносят микродозатором по 5 мм<sup>3</sup> в микроцентрифужные пробирки с реакционной смесью для амПЦР (см. 8.1.2), маркированные, соответственно, "N<sub>1</sub>" и "N<sub>2</sub>". При использовании амплификатора ДНК без подогрева крышки в каждую микроцентрифужную пробирку с реакционной смесью вносят по 30 мм<sup>3</sup> вазелинового масла для предохранения реакционной смеси от испарения водной

фазы при амПЦР. В этом случае анализируемую ДНК вносят под слой масла, в результате чего образуются водная и масляная фазы.

8.1.4 В две другие микроцентрифужные пробирки микродозатором вносят по 5 мм<sup>3</sup> раствора заведомо трансгенной ДНК (положительный контроль).

8.1.5 Затем еще в две другие микроцентрифужные пробирки микродозатором вносят по 5 мм<sup>3</sup> раствора заведомо нетрансгенной ДНК (отрицательный контроль).

8.1.6 Все микроцентрифужные пробирки со смесями, подготовленными по 8.1.3-8.1.5, помещают в амплификатор ДНК и проводят амПЦР по программе, указанной в таблице 2.

Таблица 2

Шаг программы	Температура, °С	Время инкубации	Число циклов
1	95	12 мин	1
2	95	30 с	55
	51	30 с	
	72	30 с	
3	72	10 мин	1

## 8.2 Гибридизация на биологическом микрочипе

8.2.1 Для проведения этапа гибридизации готовят N+2 микроцентрифужных пробирки вместимостью 0,5 или 1,5 см<sup>3</sup> (N - количество анализируемых проб, две другие пробирки - для анализа положительного и отрицательного контроля).

8.2.2 В необходимое количество микроцентрифужных пробирок микродозатором вносят по 18 мм<sup>3</sup> гибридизационного буфера (см. 5.36). К гибридизационному буферу в пробирку "N" добавляют по 9 мм<sup>3</sup> водной фазы ПЦР-смесей из пробирок "N<sub>1</sub>" и "N<sub>2</sub>", полученных в результате проведения амПЦР (см. 8.1.6) и перемешивают в течение 20-30 с на аппарате для встряхивания (см. 5.10) с частотой вращения не менее 1500 мин<sup>-1</sup> для получения гибридизационной смеси.

8.2.3 Из каждой микроцентрифужной пробирки микродозатором отбирают по 34 мм<sup>3</sup> гибридизационной смеси (для каждого биологического микрочипа), полученной по 8.2.2. Смесь вносят через любое из двух отверстий гибридизационной камеры, после чего оба отверстия закрывают крышкой. Гибридизацию проводят в термостате (см. 5.4) при температуре 37 °С. Минимальное время гибридизации составляет 3 ч. Допускается гибридизация в течение ночи, но не более 16-18 ч.

8.2.4 После окончания гибридизации крышку реакционной камеры открывают и микродозатором отбирают гибридизационную смесь из камеры микрочипа. В любое из двух отверстий камеры вносят 34 мм<sup>3</sup> дистиллированной воды по ГОСТ 6709, предварительно нагретой до температуры 37 °С. Воду выдерживают в реакционной камере биологического микрочипа в течение 1 мин, затем отбирают микродозатором и отбрасывают. Процедуру повторяют, после чего составную крышку отсоединяют от подложки. Подложку последовательно промывают дистиллированной водой по ГОСТ 6709, этиловым спиртом (см. 5.28), снова дистиллированной водой и высушивают при комнатной температуре.

Схема метода идентификации генно-модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения приведена в приложении А.

## 9 Обработка результатов анализа

9.1 Результаты гибридизации регистрируют с помощью УАПК. Инсталляция и эксплуатация комплекса осуществляется в соответствии с руководством по эксплуатации УАПК.

9.2 Проводят запуск программного обеспечения\*, поставляемого вместе с комплексом УАПК. При запуске на мониторе появляется схема биочипа с указанием отдельных ячеек и обозначением находящихся в них зондов. Названия зондов соответствуют указанным в таблице 1 и на рисунке 1.

\* "imageware.exe" - пример доступного программного обеспечения, пригодного для использования с описываемым методом. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не служит рекомендацией или одобрением конкретного типа оборудования.

9.3 Биологический микрочип после проведения гибридизации, промывки, удаления гибридизационной камеры, ополаскивания и высушивания помещают в держатель УАПК "лицевой" стороной (содержащей гелевые ячейки) вверх.

9.4 Нажимают пиктограмму с надписью "Пуск" в верхней части диалогового окна "Снимок". При этом происходит возбуждение флуоресценции ячеек биочипа лазерами с длиной волны 640 нм, захват флуоресцентного изображения, его обработка и выдача отчета о присутствии в анализируемой пробе ДНК растительного происхождения, идентификации видоспецифичной ДНК (соя, кукуруза, картофель, рис) и наличии/отсутствии генетических элементов, используемых как детерминанты трансгенности. Применение УАПК для анализа биологических микрочипов позволяет автоматизировать все этапы регистрации и интерпретации результатов и получать заключение о наличии/отсутствии ДНК растительного происхождения в анализируемой пробе, а также о наличии/отсутствии генетических детерминант трансгенности.

9.5 Анализ биологических микрочипов с прогибридизованными ПЦР-продуктами, полученными при амплификации ДНК, выделенной из различных анализируемых проб, начинают с регистрации и интерпретации гибридизационных картин положительного (заведомо трансгенной ДНК) и отрицательного контроля (заведомо нетрансгенной ДНК).

9.6 Результат анализа ДНК сои, содержащей трансгенные элементы, с использованием гибридизации на биочипе, представлен в **приложении Б**. Пример оформления протокола результатов испытания приведет в **приложении В**.

9.7 Если при использовании заведомо нетрансгенной ДНК регистрируют сигнал в ячейках, содержащих олигонуклеотиды, комплементарные последовательностям фрагментов векторных конструкций и маркерных генов, это свидетельствует о получении ложноположительного результата. При этом результаты анализа остальных анализируемых проб не учитываются. Причиной может быть загрязнение (контаминация) ГМИ реактивов и/или оборудования. В этом случае необходимо обработать поверхности лабораторных столов и оборудования раствором соляной кислоты по ГОСТ 3118 (0,1 моль/дм<sup>3</sup>), заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ. В случае отсутствия сигналов в ячейках, содержащих зонды, специфичные к различным генетическим детерминантам трансгенности, при использовании заведомо нетрансгенной ДНК, делают заключение об отсутствии контаминации и проводят анализ проб ДНК согласно **разделу 8**.

9.8 Отсутствие флуоресцентных сигналов в ячейках, содержащих олигонуклеотиды, специфичные к гену RBCL, при использовании нетрансгенной растительной ДНК свидетельствует о получении ложноотрицательного результата. При этом результаты анализа остальных анализируемых проб не учитываются. Причиной могут быть потеря активности одного из компонентов реакционной смеси для амПЦР или несоблюдение условий проведения амПЦР и/или гибридизации на биологическом микрочипе. В этом случае необходимо заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ. Наличие сигнала в ячейках, содержащих олигонуклеотиды, специфичные к ДНК растительного

происхождения, при использовании заведомо нетрансгенной ДНК, свидетельствует об эффективно проведенной амПЦР и гибридизации на биочипе. При этом анализ проб ДНК проводят далее согласно разделу 8.

## 10 Требования безопасности

### 10.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности - по ГОСТ 12.1.004, требования электробезопасности при работе с электроустановками - по ГОСТ 12.1.019 и в соответствии с требованиями, изложенными в инструкциях по эксплуатации оборудования.

10.2 Помещение, в котором проводятся работы, должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021, оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

### 10.3 Требования к квалификации персонала

К проведению измерений, обработке и оформлению результатов измерений допускаются специалисты, имеющие специальное образование, опыт работы с данным оборудованием, освоившие настоящий метод и прошедшие инструктаж по технике безопасности при работе в лаборатории.

Приложение А  
(справочное)

### Схема метода идентификации генно-модифицированных источников растительного происхождения с использованием биологического микрочипа

А.1 Схема метода идентификации генно-модифицированных источников растительного происхождения с использованием биологического микрочипа приведена на рисунке А.1.

А - мультиплексная асимметричная амплификация ДНК образца "N" в двух независимых пробирках "N<sub>1</sub>" и "N<sub>2</sub>" с уникальным набором праймеров для получения преимущественно одноцепочечных флуоресцентно меченных фрагментов;

Б - гибридизация ПЦР-продуктов, полученных в независимых пробирках "N<sub>1</sub>" и "N<sub>2</sub>" со специфическими олигонуклеотидами, иммобилизованными на биологическом микрочипе;

В - регистрация и интерпретация флуоресцентной картины гибридизации на биологическом микрочипе. В анализируемой пробе содержится ДНК генно-модифицированной сои.

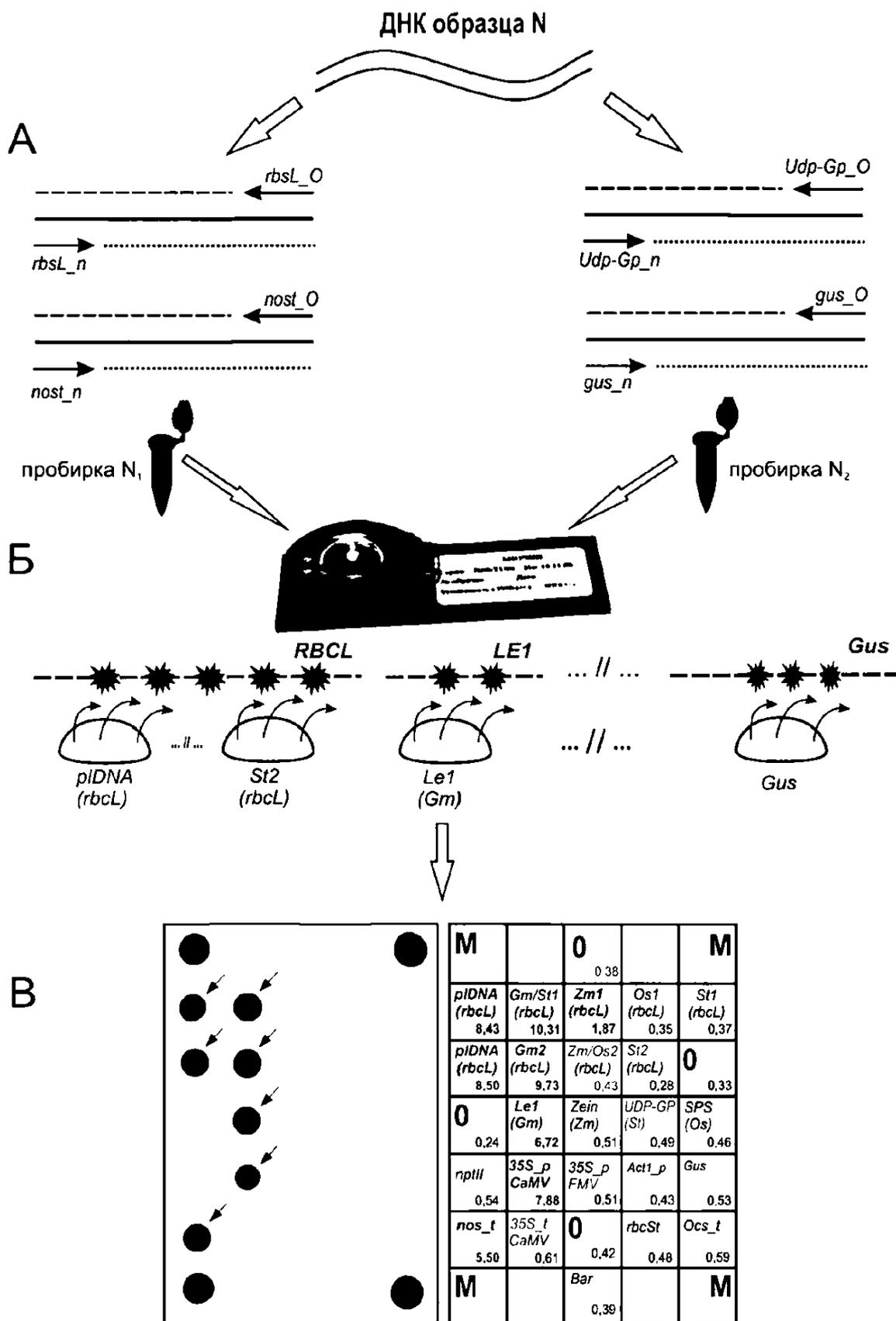


Рисунок А.1

Приложение Б  
(обязательное)

Результат анализа ДНК сои, содержащей трансгенные элементы, с использованием гибридизации на биологическом микрочипе

Б.1 Флуоресцентная картина гибридизации, полученная в результате анализа ДНК генно-модифицированной сои и распределение нормированных сигналов ячеек биологического микрочипа приведена на рисунке Б.1.

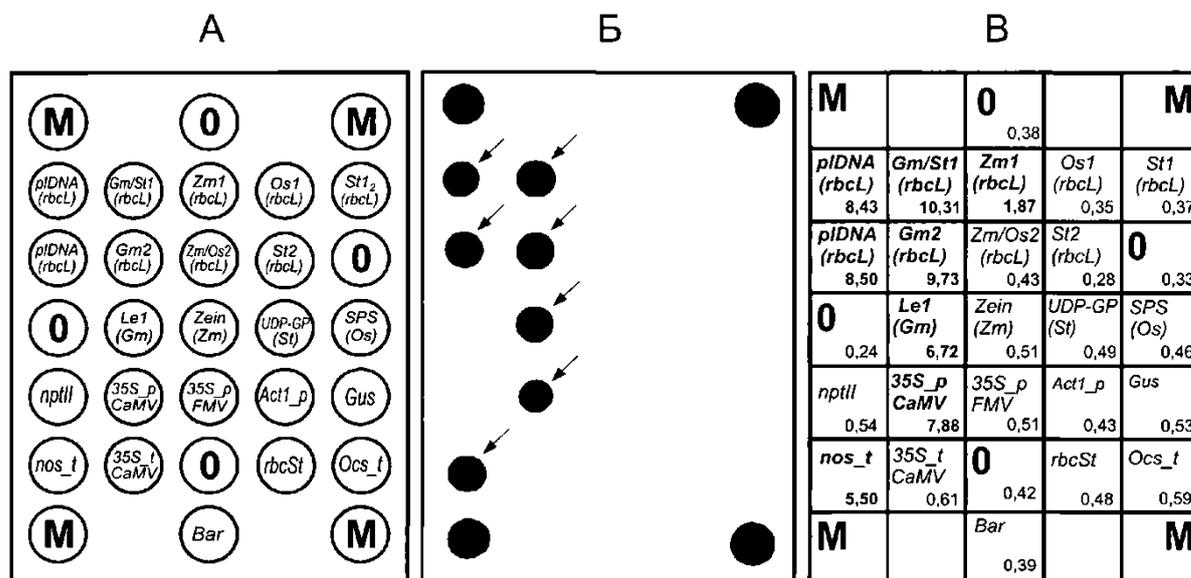


Рисунок Б.1

А - схема биологического микрочипа для идентификации генно-модифицированного источника растительного происхождения.

Б - гибридационная картина на биологическом микрочипе флуоресцентных продуктов амПЦР анализируемой ДНК сои, содержащей 35S-промотор, терминатор *nos*. Стрелками обозначены ячейки, в которых образовались совершенные гибридационные дуплексы.

В - распределение нормированных сигналов ячеек биологического микрочипа. Жирным шрифтом выделены ячейки, в которых образовались совершенные гибридационные дуплексы.

Приложение В  
(рекомендуемое)

**Пример оформления протокола испытания**

Наименование испытательной лаборатории (Центра)

**ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ**

№ \_\_\_\_\_ от "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

Даты: поступления на испытание "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.  
конца испытаний "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

Продукция: Котлеты "Любительские"

Производитель сырья или продукции: ООО "Вымпел"

Заказчик: ООО "Биотест-М"

Отбор проб проведен по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт\* (в соответствии с нормативным документом на соответствующую однородную группу сырья или продукции)

Акт отбора проб и техническое задание на испытания № \_\_\_\_\_ от "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 20\_\_

Испытания проведены на основании требований ГОСТ ...

Номер образца: 6/кс, 7/кс, 8/кс и 9/кс

Характеристика испытуемого образца (маркировка, вид и состояние упаковки, этикетки, штриховка): Маркировка на упаковке, информирующая о наличии в продукте ГМИ в образцах № 6/кс, 7/кс и 8/кс отсутствует, а в образце № 9/кс присутствует.

Маркировка: -

Годен до: -

Штриховой код (при наличии) -

Результаты испытаний:

**Таблица 1 - Нетрансгенные последовательности**

Последовательности	Номер образца			
	6/кс	7/кс	8/кс	9/кс
ген RBCL	+	+	+	+
GM/ST1 (RBCL)	+	+	+	+
ZM1 (RBCL)	-	-	-	-
OS1 (RBCL)	-	-	-	-
ST1 <sub>2</sub> (RBCL)	+	+	+	+
GM2 (RBCL)	+	+	-	-
ZM/OS2 (RBCL)	-	-	-	-
ST2 (RBCL)	+	+	-	-
Le1 (Gm)	+	+	-	-
Zein (Zm)	-	-	-	-
UDP-GP (St)	-	-	+	+
SPS (Os)	-	-	-	-

\* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 51447-99 "Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб".

Результат анализа:

- в образцах 6/кс, 7/кс, 8/кс и 9/кс обнаружены растительные компоненты:

- в образце 6/кс и 7/кс обнаружено присутствие ДНК сои;
- в образцах 8/кс и 9/кс обнаружено присутствие ДНК картофеля.

**Таблица 2 - Трансгенные последовательности**

Последовательности	Номер образца			
	6/кс	7/кс	8/кс	9/кс
nptII	-	+	-	-
35S_p CAMV	-	+	-	+
35S_p FMV	-	-	-	-
Act1_p	-	-	-	-
Gus	-	-	-	-
nos t	-	+	-	+
35S t CAMV	-	-	-	-
rbcSt	-	-	-	-
Ocs t	-	-	-	-
Bar	-	-	-	-

Результат анализа:

- в образцах 7/кс и 9/кс обнаружены следующие трансгенные компоненты:
- в образце 7/кс обнаружен гомолог гена nptII; промотор 35S CaMV и терминатор nos;
- в образце 9/кс обнаружены промотор 35S CaMV и терминатор nos;
- в образцах 6/кс и 8/кс трансгенные компоненты не обнаружены.
- маркировка на упаковке, информирующая о наличии в продукте ГМО, в образце 7/кс отсутствует, а в образце 9/кс присутствует.

Вывод: Все образцы содержат растительную ДНК, образец 6/кс содержит нетрансгенную ДНК сои; образец 7/кс содержит трансгенную ДНК сои; образец 8/кс содержит нетрансгенную ДНК картофеля; образец 9/кс содержит трансгенную ДНК картофеля.

Исполнители:

Иванов И.И.

\_\_\_\_\_

подпись

\_\_\_\_\_

Фамилия, инициалы

Петров П.П.

\_\_\_\_\_

подпись

\_\_\_\_\_

Фамилия, инициалы

Руководитель испытательной лаборатории \_\_\_\_\_

подпись

МП

\_\_\_\_\_

Фамилия, инициалы

Заключение распространяется на образец, представленный на испытания в лабораторию (Центр).

Орлова Валентина Сергеевна

Ионов Степан Викторович

Ледащева Татьяна Николаевна

**Молекулярно-биологические аспекты идентификации генетически  
модифицированных источников с применением биологического микрочипа**

Учебное пособие издано в авторской редакции

Сетевое издание

Главный редактор – Кирсанов К.А.

Ответственный за выпуск – Алимова Н.К.

Учебное издание

**Системные требования:**

операционная система Windows XP или новее, macOS 10.12 или новее, Linux.

Программное обеспечение для чтения файлов PDF.

Объем данных 3 Мб

Принято к публикации «18» января 2022 года

Режим доступа: <https://izd-mn.com/PDF/04MNNPU22.pdf> свободный. – Загл. с экрана. –  
Яз. рус., англ.

ООО «Издательство «Мир науки»

«Publishing company «World of science», LLC

Адрес:

Юридический адрес — 127055, г. Москва, пер. Порядковый, д. 21, офис 401.

Почтовый адрес — 127055, г. Москва, пер. Порядковый, д. 21, офис 401.

<https://izd-mn.com/>

**ДАННОЕ ИЗДАНИЕ ПРЕДНАЗНАЧЕНО ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ НА  
ЭЛЕКТРОННЫХ НОСИТЕЛЯХ**