



ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

Н.О. Андрейченко, студентка
Н.О. Стеценко, к.х.н., доцент

Національний університет харчових технологій

На сьогоднішній день активно розширюються галузі застосування методу полімеразної ланцюгової реакції. Його використовують у сучасній лабораторній діагностиці для ізоляції генетичного матеріалу, секвенування ДНК і виявлення генетичних хвороб, ампліфікації та вимірювання кількості ДНК, ідентифікації вірусної ДНК, при оцінці кількості ДНК і визначенні експресії генів. Він є незамінним в криміналістиці при ідентифікації особистості та при встановленні батьківства. У харчовій промисловості метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовують як спосіб контролю якості продукції та визначення генетично модифікованих організмів (ГМО) у продуктах [1].

Принцип методу ґрунтується на виявленні у матеріалі специфічних фрагментів ДНК (РНК) різноманітних біооб'єктів, їхньому вибірково синтезі до концентрації, за якої їх легко детектувати, і подальшому визначенні продуктів реакції ампліфікації – ампліконів.

В основі методу ПЛР лежить природний процес – комплементарна добудова ДНК матриці, яка виконується за допомогою ДНК-полімерази.

Ця реакція має назву реплікація ДНК. Полімеразна ланцюгова реакція представляє собою багаторазове збільшення числа копій (ампліфікація) специфічної ділянки ДНК. Можливість отримання великої кількості копій однієї точно визначеної ділянки генома значно спрощує визначення існуючого зразка ДНК. Метод ґрунтується на виявленні фрагменту ДНК або РНК, який являється специфічним для конкретного організму.

Метод ПЛР виник, коли стали використовувати фермент, який може без втрати своєї активності переносити тимчасовий температурний нагрів реакційної суміші, необхідний для денатурації ДНК – так звану термостабільну ДНК-полімеразу.

Комплементарне добудовування ланцюга починається не в будь-якій ділянці послідовності ДНК, а тільки у визначених стартових блоках – коротких двонитчастих ділянках. При приєднанні таких блоків до специфічних ділянок ДНК можна направити процес синтезу нового ланцюга тільки в цій ділянці, а не по всій довжині ДНК ланцюга. Для створення стартових блоків у заданих ділянках ДНК використовують дві олігонуклеотидні затравки (20 нуклеотидних пар), які називаються праймери. Праймери комплементарні послідовностям ДНК на лівій або правій границях специфічного фрагмента і орієнтовані таким чином, що добудовування нового ланцюга ДНК протікає тільки між ними. Для отримання достатньої кількості копій характерного фрагмента ДНК ампліфікація включає в себе декілька, як правило 20... 40 циклів.

Накопичення ампліконів в розчині відбувається за формулою 2^n , де n – число циклів ампліфікації. Тому, навіть якщо у вихідному розчині на початку знаходилась тільки одна двохланцюгова молекула ДНК, то за 30... 40 циклів в розчині накопичується близько 108 молекул амплікону. Такої кількості достатньо для детекції цього фрагменту.

ПЛР-дослідження включає в себе 3 стадії:

- виділення ДНК із зразку;
- проведення полімеразної ланцюгової реакції;
- реєстрація результатів.

Звичайна реплікація ДНК включає в себе декілька стадій – денатурацію, випал та подовження (елонгацію), які відбувається при різних температурах.

Перший етап – денатурація ДНК (розплетання подвійної спіралі, розходження ниток ДНК). На першому етапі необхідно денатурувати ДНК, яка знаходиться у зразку. Первинна високотемпературна денатурація геномної ДНК проводиться протягом 3... 10 хвилин і залежить від типу матриці. Однак оптимальним часом денатурації вважається 4... 5 хвилин. Вибір часових інтервалів і температурного режиму залежить в значній мірі від складу реакційної суміші ПЛР, типу використовуваних пробірок та моделі ампліфікатора.

Другий етап – випал. На другому етапі відбувається приєднання праймерів до відповідних послідовностей на протилежних ланцюгах ДНК на границях специфічної ділянки. Праймери вибирають так, щоб вони обмежували фрагмент і були комплементарні протилежним ланцюгам ДНК. Для кожної пари праймерів існує своя температура випалу, значення якої знаходяться в інтервалі 40...67°C. Приєднання праймерів до ДНК-мішені відбувається з утворенням коротких двохланцюгових ділянок ДНК. Для здійснення цього процесу праймери беруться у надлишку по відношенню до матриці. З утвореними комплексами праймер-матриця зв'язується ДНК-полімераза. Час випалу складає 20...60 с.

Починаючи з другого циклу, в суміші накопичуються специфічні продукти ампліфікації, так звані амплікони, які обмежуються по довжині двома праймерами. Саме цей продукт використовується для подальшої детекції.

Третій етап – добудовування ланцюга ДНК (елонгація). Комплементарне добудовування ланцюга ДНК відбувається в протилежних напрямках, починаючи з ділянок приєднання праймерів. Процес синтезу каталізується ферментом термостабільною ДНК-полімеразою і відбувається при температурі 70...72°C. Час проходження синтезу – 20...40 секунд.

В подальшому етапи денатурації, випалу та елонгації багаторазово повторюються (30 і більше разів). На кожному циклі кількість синтезованих копій фрагменту ДНК подвоюється.

На даний час з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) проводиться контроль за наявністю ГМО в харчових продуктах методом ідентифікації трансгенної ДНК. З одного боку, це обумовлено чутливістю методу ПЛР, оскільки для аналізу потрібна зовсім незначна кількість вихідного матеріалу, а з іншого, тим, що молекула ДНК є достатньо стійкою до впливу різних факторів, тому її можна аналізувати як у сирому рослинному матеріалі, так і в харчових продуктах, які містять інгредієнти, отримані з генетично модифікованих рослин [2].

Список літератури

1. Стегній, Б. Т. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях / Б. Т. Стегній, А. П. Герілович, О. Ю. Лиманська. – Х. : НТМТ, 2010. — 227 с.
2. Впровадження методів оцінки наявності та вмісту генетично модифікованих компонентів у продуктах харчування, кормах і парфумерно-косметичних виробах/ Я.Б. Блюм, М. О. Банникова, П. А. Карпов та ін. // Наука та інновація. –2008. – Т4. – №2. – С. 40-48.