

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев Университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

Тусупханова Айнур Серікқызы

Өсімдік тектес тағамдық өнімдердің құрамындағы ГМО анықтау

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

5B070100 - «Биотехнология» мамандығы

Алматы 2020

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев Университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ

ХжБИ кафедрасының меңгерушісі

_____ Г.Ж. Елигбаева

«__» _____ 2020 ж.

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Өсімдік тектес тағамдық өнімдердің құрамындағы ГМО анықтау»

5B070100 - «Биотехнология» мамандығы

Орындаған:

Тусупханова А.С.

Ғылыми жетекші

Б.ғ.д., қауымдастырылған профессор

_____ Г.В. Курбанова

«__» _____ 2020 ж.

Алматы 2020

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев Университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ
ХжБИ кафедрасының меңгерушісі
_____ Г.Ж. Елигбаева
«__» _____ 2020 ж.

**Дипломдық жұмысты орындауға
ТАПСЫРМА**

Білім алушы Тусупханова Айнур Серікқызы

Жобаның тақырыбы: Өсімдік тектес тағамдық өнімдердің құрамындағы ГМО анықтау

Университет Ректорының «27» қаңтар 2020 жылғы №762-б бұйрығымен бекітілген.

Орындалған жұмыстың өткізу мерзімі «20» мамыр 2020 ж.

Дипломдық жұмыстың бастапқы мәліметтері: Диплом алды практикасындағы жиналған мәліметтер.

Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі:

а) өсімдік тектес тамақ өнімдерінің құрамындағы ГМО анықтайтын әдістермен танысу;

ә) зерттеу нысандары мен қажетті материалдарды дайындау;

б) нақты уақыттағы ПТР әдісі арқылы ГМО сапалық және сандық анықтау.

Ұсынылған негізгі әдебиет: 17 мақалалар мен кітаптар

Дипломдық жұмысты даярлау
КЕСТЕСІ

Бөлім атаулары, қарастырылатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекшіге, кеңесшілерге өткізу мерзімі	Ескерту
Әдебиетке шолу	қаңтар	
Материалдар мен әдістер	ақпан	
Зерттеу нәтижелері	наурыз	

Дипломдық жұмыс бөлімдерінің кеңесшілері мен
норма бақылаушының аяқталған жұмысқа қойған
қолтаңбалары

Бөлімдердің атауы	Кеңесшілер (аты-жөні, тегі, ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған мерзімі	Қолы
Норма бақылаушы	Б.ғ.д., қауымдастырылған профессор Г.В. Курбанова		

Ғылыми жетекшісі _____ Г.В. Курбанова

Тапсырманы орындауға қабылдаған білім алушы _____ А.С. Тусупханова

Күні «__» _____ 2020 ж.

АНДАТПА

«Өсімдік тектес тағамдық өнімдердің құрамындағы ГМО анықтау» атты дипломдық жұмыс қағаз түрінде 29 беттен тұрады. Жұмыс кіріспеден, әдебиеттік шолудан, зерттеу материалдары мен әдістерден және зерттеу жұмысы нәтижелерімен, қорытынды, пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады.

Жұмыстың мақсаты ПТР Real-Time әдісімен өсімдік тектес азық-түлік өнімдерінің құрамының генетикалық модификациялық организм болуын анықтау.

Әдебиет шолуында гендік модифицирленген азық-түлік өнімдерін алу, олардың табиғатта таралуы және олардың шектеулері туралы талдау жүргізілді, сонымен қатар өсімдік тектес азық-түліктердің құрамындағы ГМО анықтау әдістері қарастырылды.

Зерттеу нысандары тағам өнімдері болды. Өнімдерден ДНҚ бөлу үшін Soya 356043 GMO standart set TERM-BF 425, Fluke USA жиынтығы қолданылды.

Нәтижесінде, зерттелген тағам өнімдерінің (ірімшік, конфеттер) құрамында гендік модификацияланған организмдердің болуы 0,9%-дан аспайтындығы анықталды.

АННОТАЦИЯ

Дипломная работа на тему: "Определение ГМО в составе пищевых продуктов растительного происхождения" в бумажном носителе изложена на 29 страницах. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, выводов, списка использованных источников литературы.

Целью работы является определение содержания генетически модифицированных организмов растительного происхождения, используемых в пищевых продуктах методом ПЦР Real-Time.

В обзоре литературы проведен анализ о получении и распространении в природе генно модифицированных пищевых продуктов и их ограничениях, а также рассмотрены методы определения ГМО в составе пищевых продуктов растительного происхождения.

Объектами исследования были пищевые продукты. Для выделения ДНК из продуктов были использованы Soya 356043 GMO standart set ERM-BF 425, Fluka USA.

В результате проведенного исследования выявлено, что содержание генетически модифицированных организмов в составе исследованных пищевых продуктов (сыр, конфеты) не превышает 0,9%.

ANNOTATION

The diploma work "the Determination of GMOs in the composition of food products of plant origin" on paper consists of 29 pages. The work consists of an introduction, a review of the literature, materials and methods of research, the results of their own research, conclusions, and a list of literature sources used.

The purpose of this work is to determine the content of genetically modified plant products by Real-Time PCR.

The literature review analyzes the production and distribution of genetically modified foods in nature and their limitations, as well as methods for determining GMOs in plant-based foods.

The objects of research were food products. Soya 356043 GMO standart set ERM-BF 425, Fluke USA were used to isolate DNA from products.

As a result, it was found that the content of genetically modified organisms in the composition of the studied food products (cheese, candy) does not exceed 0.9%.

МАЗМҰНЫ

Кіріспе	9
1 Әдебиетке шолу	10
1.1 Гендік инженерия пайдаланып гендік модификацияланған өнімдерді алу кезеңдерінің дамуы	10
1.2 Гендік модификацияланған өнім стандарттары және биоқауіпсіздік	10
1.3 Гендік модификацияланған өнім алу тәсілдері	12
1.4 ГМО шектеулер мен тәуекелдер	14
1.4.1 ГМО зияны және әсері	15
1.5 ГМО оқшаулау (анықтау) әдістері	16
1.6 Нақты уақыттағы ПТР әдісі	16
2 Материалдар мен әдістер	19
2.1 Зерттеу нысандары	19
2.2 ПТР анализ реакция кезеңдері	20
2.3 Қажетті реактивтер жиынтығы мен құрылғылар	20
2.4 Зерттеу кезеңдері және әдістер	21
2.4.1 ДНҚ бөліп алу кезеңі	21
2.5 Амплификация. ГМО сапалық анықтау	23
2.6 ГМО сандық анықтау	25
3 Зерттеу нәтижелері	29
3.1 ГМО сапалық анықтау нәтижелері	29
3.2 ГМО сандық анықтау нәтижелері	30
Қорытынды	34
Қысқартылған сөздер тізімі	35
Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	36

КІРІСПЕ

БҰҰ-ның ауыл шаруашылығы мен тағам өндірісінің статистика мәліметі бойынша, қазіргі таңда әлемдегі адамдардың жартысынан астамы құнды тағаммен толық қамды қамтамасыз етілмесе, 500 млн. адам аштыққа, ал 2 млрд. адамдар дұрыс тамақтанбайды делінген. Биотехнологияның негізгі мақсаты коммерциялық өнімдерді өндіруді дамыту. Сондықтан биотехнология саласының негізінде экономика жатыр.

Биотехнология саласын ауыл шаруашылығында, денсаулық сақтау және фармацевтикада, қайта өңдеу, қоршаған ортаны қорғау үшін және тамақ өнеркәсібінде тиімді пайдалану арқылы осы салаларды дамытып және бірқатар проблемаларын шеше аламыз.

Өсімдіктер биотехнологиясы – өнімдердің қоректік құндылығын арттыруға, қолайсыз табиғи жағдайларға, әртүрлі зиянкестер мен фитопатогенді микроорганизмдердің әсеріне төзімділігін арттыруға, мәдени өсімдіктердің түрлерін, сорттарын көбейтуге және генетикалық ресурстарын сақтау мәселелеріне негізделген. Өсімдіктер биотехнологиясы гендік инженерия әдістеріне және жасушалардың, ұлпалар мен протопласттардың дақылдарын пайдаланатын жаңа технологияларға сүйенеді.

Қазіргі таңда гендік модификацияланған тамақ өнімдерін өндіру қарқынды дамуда және оларға қойылатын талаптардың сақталуы міндет. ГМО тамақ өнімдерінде болу стандартты 0,9% және ол міндетті түрде өнім сыртында таңбалануы қажет. ГМ өнімдер өте көп өндірілуіне байланысты оған заң түрінде шектеу және қатаң тексеріс (азық-түлік құрамындағы ГМО анықтау) қойылуда. 2000 жылы мамырда ВОЗ 53-ші Ассамблеясы генетикалық модификацияланған тамақ өндірісіне байланысты мәселелерді, денсаулық сақтау және қорғауға бағытталған жұмыстар жүргізу базасын құру туралы шешім қабылдады [1].

Жұмыстың мақсаты: Голландиялық ірімшік (Диканька), конфет (Milky Way) өнімдері құрамында кездесетін соя өсімдігінде ГМО болуын нақты уақыттағы ПТР әдісі арқылы зерттеу.

Жұмыстың міндеті:

1 ГМО жайлы және оған қойылатын шектеулер туралы әдебиеттік шолу жасау.

2 Қажетті нысандарды таңдау және әдістермен танысу.

3 Real Time Step ne Plus құрылғысымен нақты уақыттағы ПТР анализ жүргізу және нәтижесінде ГМО сапалық және сандық зерттеу жұмыстарын жүргізу.

1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ

1.1 Гендік инженерияны пайдаланып гендік модификацияланған өнімдерді алу кезеңдерінің дамуы

ГМО (гендік модификацияланған организмдер) – гендік инженерия саласының негізгі табысты өнімі. Гендік модификацияланған организм дегеніміз – бөтен ағзаның генін бір ағзаға енгізу арқылы жаңа ген, яғни жаңа табиғатта кездеспеген ағзаны алу. Мысалы картоптың колорадо қоңызын жолатпайтын түрі өндірілген. Алғаш гендік модификацияланған өсімдіктерді 1983 жылы Америка биологиялық қару ретінде жасаған. Ал 1986 жылы гендік модификацияны суыққа төзімді өсімдіктер алуда пайдаланған. Бұл сол кезеңдегі үлкен табыстың бірі болды. 1992 жылы Қытайда осы әдіспен темікі өндірілген, ол зиянкестерге залал келтірмейтіндей өндірілген. 1994 жылы жеткізу кезінде бұзылмай сақталатын қызанақ өндірілген. Сол кезеңдерден бастап «ГМО мәдениетінің» кезеңі басталған [2].

2006 жылы 22 елдің 10,3 млн. фермері 102 млн. гектар жерден гендік модификацияланған өсімдіктің әртүрлерін өндіріп алған. Сол кездері осы әдіспен өсіріп алынған өнімдер алма, картоп, жүгері, мақтаға мүлдем құрт түспеген. 2006 жылы 97% гендік модификацияланған өсімдіктер алынған, АҚШ (53%), Аргентина (17%), Бразилия (11%), Канада (6%), Индия (4%), Қытай (3%), Парагвай (2%), Оңтүстік Африка (1%). Әлемде ГМО негізгі 8 дақыл кеңінен өндірілген: соя, жүгері, мақта, рапс, асқабақ, папайя, жоңышқа, күріш. Ал 100% егістікте 4 дақыл кеңінен қолданылады: соя, жүгері, мақта, рапс [3].

АҚШ ГМО өндіру, сату нарығында бірінші орынды алады, өнімдері негізгі 2 қасиетке ие : зиянкестерге және гербецидтерге тұрақты. АҚШ-та «Monsanto» компаниясы шығарған гендік модификацияланған жүгері, соя нарықта көш бастап тұр [4].

ГМО қазіргі таңда кеңінен қолданылуда тек қана өсімдік өндірісінде емес тағы басқа медицина саласында, фармацевтикада, тамақ өнеркәсібінде де кеңінен қолданылады.

1.2 Гендік модификацияланған өнім стандарттары және биоқауіпсіздік

ГМО кейінгі 10 жылдағы ғылыми техникалық дамудың жетістігі болып табылады. ГМО Дарвин эволюциясының нәтижесі ретінде көрініс табады, алайда уақыт өте келе өзгеріске ұшырауы мүмкін. Бұл мәселе экономикада ауыл-шаруашылығы маңызды мемлекеттерге қатысты.

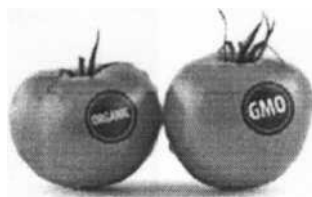
Биологиялық алуан түрлілік (1992 жылы) жайында БҰҰ конвенциясының даму негізінде БҰҰ елдері 2000 жылы «биологиялық қауіпсіздік» жайлы хаттама қабылдады. Хаттаманы қабылдаудың себебі – әлемде ГМО-ң бақылаусыз таралуын шектейтін ұйымдардың көптігі болып

табылады. ГМО-ң таралуын шектейтін хаттама 2007 жылы шілде айында қол қойылды, әлемнің 141 елдері хаттаманы заңды түрде күшіне ендірді. Бірақ ГМО-ны өндіруші АҚШ, Ресей, Канада сияқты мемлекеттер хаттаманы жақтамады. Еуропалық одақ және құрамына кіретін мемлекеттер хаттаманы заңды күшіне ендірген және белсенді жұмыстарын атқарып жатыр [5].

Қазіргі таңда ГМО өндірісінің технологиясы толық жасалынбаған, себебі: адамға және қоршаған ортаға тигізетін биологиялық және экологиялық зардаптардың негізгі көзі болып табылып отыр. ГМО өнімдерді алу технологиясы күрделі болып келеді және көп құбылысты сондықтан өнімдерін пайдалану кезінде және коммерциялық ГМО өсіру кезінде биологиялық тәуекелдің болуымен сипатталады.

2004 жылы Қазақстан Республикасында ГМО-ны пайдалануда заңды институтционалды және практикалық шаралар негізінде жахандық экологиялық қор және БҰҰ қоршаған орта бағдарламалары қолданылумен Қазақстан үшін биоқауіпсіздік ұлттық стратегиясы ұйымдастырылды. Қазіргі таңда ұйымдастырылған шараларды белсенді түрде мемлекетте жүзеге асырудың екінші кезеңі жасалып жатыр. Қазақстан Республикасының Экологиялық кодексі пайдаланушыларды ГМО жасалған тағамдармен, өнімдермен әрдайым хабардар етуі міндетті. Экологиялық кодекс ГМО арқылы алынған өнімдердегі ГМО құрамындағы шегін белгілейді [6].

Мемлекеттік органдар ГМО бар барлық азық-түлік пен өнімдерді таңбалау деген ережелерді ұсынды. Өнімдерді міндетті түрде таңбалау керек. Барлық өнімді таңбалау мақсаты: тұтынушыларды өнімде ГМО бар немесе жоқ екендігін хабардар ету. Азық-түліктің белгілі бір түрлеріне «ГМО» немесе «ГМО көздерден алынған өнімдер» немесе өнімде «ГМ көздерден алынған компоненттер бар» деп таңбалануы қажет [6].



1 Сурет – Қызанақтың ГМО екендігін білдіретін таңба

Қазіргі уақытта заңда және ішкі сауданың ережелерінде сандық көрсеткіштер пайда болды. 34 бап бойынша азық-түлік өндірісінде ГМО нысандардың қауіпсіздігінің негізделген растамасы бекітілгенге дейін азық-түлік өнімдеріндегі олардың деңгейі Еуропалық одақта көрсетілген көрсеткіштен жоғары болмауы тиіс.

2007 жылы Қазақстанда ГМО азық-түлік өнімдері, өндіру, өңдеу, қолдану, сату және қоршаған ортаға шығару туралы ақпаратқа кепілдік беретін Қазақстан Республика Экологиялық кодексі күшіне енді. 2006-2007 жыл «ГМО-

дан бос Қазақстан» науқаны шеңберінде «экологиялық сараптама», «нормативтік-құқық» деген мәселелер бойынша жұмыстар жүргізілді [7].

Нормативтік-құқықтық базаны ұсынғаннан кейін, Қазақстанда соңғы жылдары ГМО мәселесіне аса көп назар аударылды. Өкінішке орай заңда кемшіліктер әліде бар. Қазақстан дүниежүзілік сауда ұйымына кіруі үшін, биоқауіпсіздік жүйесін жетілдіру және осы кемшіліктерді жоюға байланысты жұмыстарды тездетуі қажет.

1 Кесте – Экологиялық кодекс бойынша ГМ-ингредиенттерін таңбалау

Нормативтік - құқықтық акт	ГМ-ингредиенттері бар болған жағдайда таңбалау	Гендік модификацияланған өнімдерді пайдалану	Статусы
ҚР экологиялық кодексі	Барлық өнімдердің санына қарамастан таңбалануы қажет	Қоршаған ортаны қорғау саласындағы уәкілетті органмен және халықтың санитарлық-эпидемиологиялық салауаттылығы саласындағы органмен	Күші бар
«Тамақ өнімдерінің қауіпсіздігі туралы» заңы	Міндетті түрде таңбалануы қажет	Рұқсат етіледі, егер қауіпсіздік азық-түлік өнімдерінде олардың мазмұнының деңгейінде	Күші бар
Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрінің № 447 бұйрығы	Құрамы 5% -дан асқан жағдайда	ҚР аумағында алғаш рет өндірілетін және импортқа мемлекеттік тіркеуден өткеннен кейін ғана жол беріледі	Күші бар

1.3 ГМО өнім алу тәсілдері

ГМО-ны алу бір ағзаның генінің бөтен ағза жасушасының геніне бөліну, көбею, алмасу және экспрессия әдістерімен байланысқан «гендік инженерия» нәтижесі. ГМО алудың негізгі этаптары:

1) Басқа ағзаның геніне енгізетін генді бөліп алу және окшаулау (ДНК, РНҚ фрагменттеріне сәйкес келетін) қажет. Жеке гендерді бөліп алатын ағзадан химиялық әдіс көмегімен, алдымен нуклеин қышқылымен бөліп алады. Рестриктаза ферменті арқала оларды жеке бөліктерге бөледі. Ең маңызды рестриктаза нуклеин қышқылында жабысқақ (комплементарлы) ұштарының пайда болуына дейін бөлінетін рестриктаза. Алынған бөліктер бірнеше нуклеотидтен тұратын, қысқы бір жіпшелі ұштардан құралған. Егер 1 пробиркада жабысқақ ұштары пайда болатын бір рестриктаза көмегімен

алынған шығу тегі әр түрлі ағзаның ДНҚ фрагменттерін біріктіріп, лигаза ферментін қосатын болса, онда алынған бөліктер бір-бірімен бірігеді. Нәтижесінде әртүрлі ДНҚ бөліктерінен тұратын химералы (рекомбинантты) ДНҚ пайда болады.

2) Енгізілген клонды клондау (көбейту). Пробиркадағы ДНҚ рекомбинантты молекуласы фрагменттері бар векторды көбейту үшін реципиент жасушасына аудару қажет. Плазмидті векторлар реципиент клеткасына гендік трансформация әдісі арқылы енгізіледі. Векторлы ДНҚ-ны көбейту негізінде ішек таяқшасы *E.coli* жасуша трансформациясы кеңінен қолданылады. Рекомбинантты молекула құру мақсатында векторда болған сұрыптаушы маркерден тұратын сұрыптау ортасындағы трансформациялаушы бактерияларды жасушасына іріктеу жұмысы жүргізіледі. Мысалы: егер вектор ампициллин антибиотигіне қарсы тұру үшін сұрыптау ортасына антибиотик қосады.

3) Жасуша ішіне генді енгізу (трансгенді конструкция), реципиент ағзаға ДНҚ-ны енгізу. Рекомбинантты ДНҚ-ны жасушаға енгізу. Гибридті молекулаларды жасушаға енгізу әдістері векторға байланысты, егер вектор ретінде плазмида қолданылса онда енгізу трансформация әдісімен, егер фаг қолданылса онда трансфекция әдісімен өтеді. Трансформация мен трансфекция жолы бактерия жасушасының Са тұздарымен (CaCl_2) өндегенде олардың мембраналарының ДНҚ-ны өткізе алатындығына негізделген. Экзогенді (бөтен) ДНҚ-ның жасушаға ену тиімділігі төмен. Алдамен CaCl_2 мен өндеген жасушаға мәселен: 1 мкг рВг 322 плазмидасын қосса, онда әрбір 10⁴-10⁵ плазмиданың біреуі ғана жасушаның ішіне енеді, яғни бактерия аз бөлігі ғана трансформациялана алады. Егер клеткаға рДНҚ молекуласын көп мөлшерде енгізсе, онда оның рестриктазалары оларды ыдыратып үлгере алмайды. Бактериялық рестриктаза кесіп үлгермеген рДНҚ біраз бөлігі рестриктаза танытын орындарда метилденіп, модификацияланып кетеді. Ғалымдар ГИ тәжірбиелерінде рестриктазалық ферменті жоқ бактериялы жасушаларды жиі қолданады. Себебі мұндай рестрикцияланбайтын жасушада әдетте модификациялаушы фермент болмайды.

4) Ген клонын көбейту. Белгілі концентрациялы бактериялық суспензияны қатты ет-пептонды қоректік ортаға мысалы: қосымша қоректік заттар бар ағараға егеді, сонда петри шыны ыдысының 1 см² бетіне 1-10 бактерия келуі керек. Агардың үстіне түскен бактериялық жасуша бөліне бастайды, соңында олардың ұрпақтары сыртқы пішіні бойынша саңырауқұлақ қалпақшасына ұқсас кішігірім шоғырланып түзіледі. Әр шоғыр бастапқы 1 бактериялық клеткадан түзілген және одан айнымайтын көптеген жасушаларды клон деп атайды. Енді генде жинағын, әртүрлі клондар арасынан қажет генді табу керек. Бұл процесс скрининг деп аталады. Гендер жинағы аз болған сайын одан қажет генді табу оңай. Комплементарлы ДНҚ клонын көбейту әдісі гендер жинағы мөлшерін азайтуға әкеледі. Ең кең тараған әдіс – гибридизациялау деп аталады. Ол үшін петри шынысындағы негативті шоғырларға нитроцеллюлозалы сүзгіні беттестіреді, нәтижесінде ДНҚ молекуласы сүзгіге

жабысады. Сүзгінің газонға сәйкес орны дәлдікпен белгіленуі қажет. Мысалы: сүзгімен оның астындағы газоны бар агарды инемен бірнеше жерінен шаншиды. Одан кейін сүзгіні тезірек 0,5 мл NaOH пен өңдейді, кейін бейтараптайды. Осының нәтижесінде қос тізбекті ДНҚ молекулалары жеке тізбектерге бөлініп (денатурация) нитроцеллюлозамен байланысады [8].

1.4 ГМО шектеулері мен тәуекелдері

Гендік модификацияланған организмдардың биологиялық тәуекелдерінің себептері:

Белгілердің полигенділігі. Көптеген шарауашылыққа бейімді және құнды маңызды белгілер табиғаты жағынан полигенді болып келеді. Бұл белгілер цитоплазмалық және ядролық гендер арқылы бақыланады. Жоғары сатыдағы өсімдіктердің гені 50000 жуық гендердің кейбір түрлері 200-300 гені анықталған. Шаруашылық құнды және бейімдік маңызды белгілер гендік дәрежеде оқшауланбаған және биохимия жағынан сипатталмаған.

Реципиент ағза геномына (өсімдік) ДНҚ-ның бөтен фрагментін (адамның немесе балықтың бактерия ДНҚ-сы) енгізу. Бұл гендік инженериядағы негізгі кемшілік. Қазіргі таңда ғалымдар ДНҚ - ның бөтен фрагментін нақты анықталған реципиент организм геномына енгізе алмайды. Себебі: жоғары сатыдағы организмнің гендік аппаратаның жұмыс істеу тетіктері зерттелмеген.

Енгізілген геннің плейотроптық әсері. Плейотропия – геннің екі немесе көптеген белгілерге әсер ету қабілеттілігі. Бөтен енгізілген геннің жұмысы айналасындағы шаруашылық гендер сияқты хромосоманың қай аймағына ДНҚ бөтен фрагменті енгізілетіндігіне байланысты. Осындай жағдайларда күтпеген жағдайдан жұмыстың ауытқушылығы болуы мүмкін. Бұндай ауытқушылықтарға жасушаға тән емес жасушадағы зат алмасу бұзылуы, уытты немесе аллергиялық қосылыстардың синтезі т.б. болуы мүмкін [9].

Геном тұрақтылығының ауытқушылығы және бөтен ақпараттың ДНҚ фрагменті негізіне берілуінің өзгерісі. Белгиялық ғалымдардың зерттеу тұжырымдамалары бойынша көп таралған коммерциялық өсімдік сорттарының гені (мысалы раундап гербецидтерге тұрақты, «Monsanto» компаниясының трансгенді соясы) басқа өсімдікке енгізілген кезде гендік тұрақтылықты сақтамайды, қоршаған ортаға және адам денсаулығына зиянын тигізеді [10].

Енгізілген ДНҚ фрагментінде технологиялық қажетсіз шығындылардың болуы. Яғни өсімдікке жаңа қасиет, жаңа бейімділікке алып келуі. Мысалы: жағымсыз салдардың болуы, гендердің антибиотиктерге тұрақтылығы. Бөтен ақуыздың аллергиялық және зиянды әсерлері. ГМО-ны кеңінен коммерциялық пайдаланудың немесе ГМО-дан тамақ алу кезінде, өндірушілер ГМО-ны пайдаланып мақсатты өнім алу кезінде ең бастасы «ГМО-ң биоқауіпсіздігіне» назар аударғаны дұрыс [11].

1.4.1 ГМО әсері мен зияны

Америкалық Экологиялық Медицина Академиясы дәрігерлерді ГМО бар өнімдерді қолданудан сақтануды емделушілерге ескерту керек дейді. Олар мұндай өнімдердің ағзаға, асқорыту жүйесіне және иммундық жүйелерге зиян келтіретіні, қартаю процесін жылдамдатады және бедеулікке әкеледі деген тұжырымдама жасаған. Зерттеулер бойынша мұндай өнімдер ағзаға жаңа материалдар алып келеді және ағзада ұзақ уақыт бойы сақталып, көптеген зиянын келтіреді [2]. Мысалы: соя бұршағының құрамындағы ген, біздің ішімізде тіршілік ететін ДНҚ бактериясына енуі мүмкін. ГМ жүгері шығаратын уытты инсектицидтар жүкті әйелдің қанымен және оның ұрығына түсуі мүмкін. 1996 жылы ГМО өнімдер шығарылғаннан кейін көптеген аурулар пайда болды. Тамақ аллергияларымен және аутизм, репродуктивті бұзылулар, ас қорыту жүйесінің бұзылуы т.б. аурулар кеңінен тарай бастады. Америка Денсаулық сақтау қауымдастығы ескертуі бойынша күйіс қайыратын жануарлардың модификацияланған гормоны сиыр сүтіндегі, рак ауруымен байланысты IGF-1 гормонының көрсеткішін көтереді [12].

Гендік модификацияланған дақылдар мен олармен байланысқан гербецидтер құстарға, жәндіктерге, қосмекенділерге, теңіз мекендеушілерімен жерде өмір сүретін ағзаларға зиянын келтіреді. Олар түрлерді төмендетеді, суларды ластайды және экологиялық таза емес. Мысалы, ГМ культура монарх көбелектерінің санын АҚШ-та 50% төмендетті. Гербецидтер зерттеулер көрсеткендей, тіпті аз мөлшерде қосмекенділердің туа біткенде даму ақауларына, эмбриондардың өлімі, эндокриндік бездердің бұзылуы және жануар ағзаларының зақымдануына әкеледі [2].

Бактериялық вирустар үшін тірі организм мекендеу ортасы болып табылады. Жануар немесе өсімдік организміне түскенде олар бейімделе бастайды, иммундық жүйемен күреседі және аман қалуға тырысады. Сондықтан ГМО жасау үшін қолданылатын бактериялар мен плазмидтер ешқайда жоғалмайды. ГМ өнімдерін тұтынғанда біздің ағзамызда немесе жануар ағзасында қалады. Асқазан және ішекке түскенде ГМО трансгенизация (мутация) кезіндегідей біздің ағзамызда да болады. Ішекте адамның иммундық жүйесінің 70% жуығы орналасқан. Иммунитет төмендейді, қан арқылы плазмидтер мен ГМ өнімдері барлық органдарға, бұлшық еттер мен тіпті адамның немесе жануардың терісіне түседі және олардың түрін өзгертеді. Тіпті ГМО азықпен тамақтанған жануардың етін адам жесе оғанда кері әсерін тигізеді. Бұл жыныстық жасушаларға қауіпті. Жыныстық мутант жасушаларынан басқа өсімдіктер мен жануарлардың түрлері мен сыныптарынан гендері бар балалар пайда болады. Көбінесе осы генетикалық «химер» бедеулікке алып келеді [13].

Биотехнология салысындағы көптеген компаниялар ГМО өнімдер зияны жоқ екенін дәлелдеуге тырысады. Тәуелсіз ғалымдар бұл пікірлерді жоққа шығарып, істің мүлдем өзгеше екенін дәлелдеп шығарды. Көптеген

компаниялар ГМО зиян екенін жоққа шығарып, қиындықтардан қашып, тек экономикалық қаржы жағын ғана ойлауда.

1.5 ГМО-ны сәйкестендіру (оқшаулау) әдістері

Бөтен ДНҚ фрагментін анықтауда қазіргі таңда әртүрлі ПТР (полимеразды тізбекті реакция) түрлері пайдалануда.

Бұл әдіс ДНҚ фрагментіндегі бөтен немесе өзгерген генетикалық материалды анықтайды. Молекулалық биологияда жақсы зерттелген ферменттердің істейтін жұмысына ПТР әдісі кеңінен қолданылады. ДНҚ-полимеразды ферменттердің жұмысы екіншілік немесе ДНҚ тізбегінің комплементарлы синтезіне негізделген. Бірнеше мың немесе көптеген мың буынды, біртізбекті матрицалық ДНҚ-ға олигонуклеотидті праймер қосу арқылы алуға болады [14]. Реакцияның тоқтауын температураны жоғарлата отырып қол жеткізсек болады. Реакция тоқтап, ДНҚ тізбегінің денатурация болуына мүмкіндік береді. Егер өз көлемінен праймер асып кететіндей болатын болса, температураны төмендету керек, себебі ДНҚ-ның комплементарлы бөлігімен сәйкестенуі қажет. Температураны тұрақтандыру үшін полимеризация реакциясына керекті ферментті салуға болады. Алғашқы алынған өнімнің мөлшерін осы барлық факторларды ескеріп, арттыруға, көбейтуге болады. ДНҚ фрагментінің көптеген қажетті көшірмесін осы процедураларды шексіз қайталап жасау арқылы алуға болады. ПТР-ның бір циклы 1-2 минут ішінде жұмысын атқарады, ал бір сағаттың ішінде 100 млрд көшірмесін алуға болады [15].

ПТР әдісінен басқа, ДНҚ-ның трансгенді фрагментін анықтау үшін басқада көптеген әдістер қолданылады:

- 1 Трансгенді ақуыздарды зерттеуге негізделген ГМО-ны анықтайтын әдіс.
- 2 Хроматографиялық әдіс.
- 3 Спектроскопиялық әдістер.
- 4 ДНҚ-чиптерінің технологиясы.

1.6 ГМО анықтау үшін нақты уақыттағы ПТР әдісі

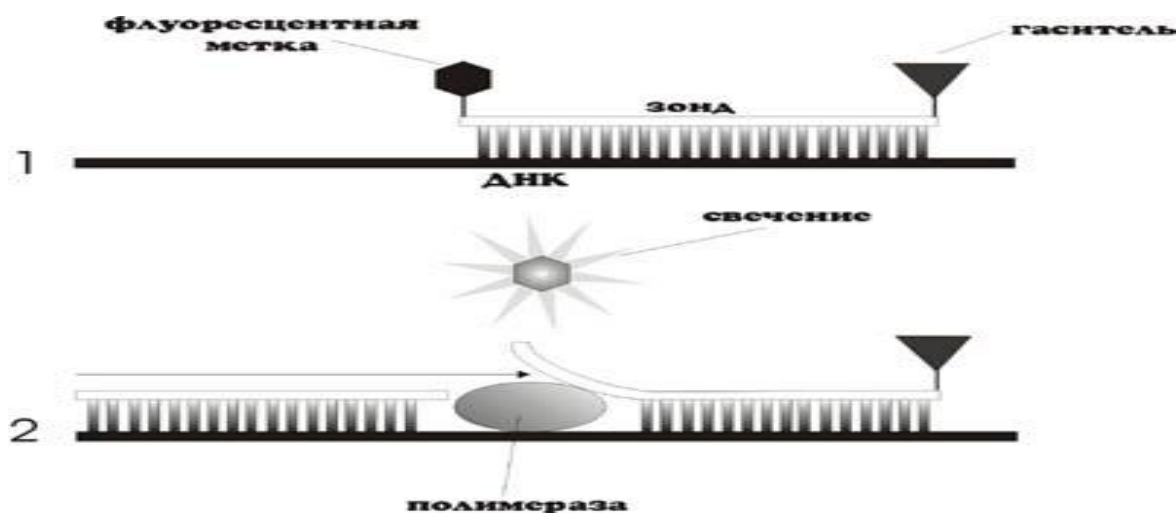
Өсімдік тектес өнімдермен мен тағамдық өнімдерде ГМО анықтау әдісі нақты уақыт режиміндегі полимеразды тізбекті реакцияны қолдануға (ПТР) негізделген. Нақты уақыттағы ПТР әдісі өнімнің жинақталу процесін бақылауға мүмкіндік беретін флуоресценция сигналын детектеуге негізделген. ПТР (Real-time PCR) әдісінің мәні электрофорезсіз арнайы құрылғы көмегімен амплификация өнімдерінің жинақталуын зерттеу болып табылады. Амплификация өнімдерінің жинақталу кинетикасы матрицаның алғашқы санымен байланысты болғандықтан, бұл оның санын дәлме-дәл бағалауға мүмкіндік береді. Классикалық ПТР қарағанда бұл әдістің ерекшелігі

зерттелетін өнімдерде инфекциялық агенттердің ДНҚ/РНҚ нақты сандық анықтауға болатындығы және электрофорез сатысының болмауы, ПТР зертханасында жұмыс жасауға қойылатын ерекше қатаң талаптар және алынған нәтижелерді автоматты түрде тіркеу және түсіндірілуі. Электрофорез сатысының болмауының артықшылығы, жалған оң көрсеткіш санын азайтуға мүмкіндік береді. Нәтижелерді тіркеу ПТР процессінің өзінде жасалатындықтан, бұл талдау зертханалық жұмыстарды бір-екі бөлмелі зертханалық орындарда жүргізуге болады [16].

ПТР нақта уақытта қою үшін арнайы амплификациялау жүргізу керек. ПТР нақты уақыт режимінде амплификация өнімдерін анықтау үшін мына әдістер қолданылады:

1. 5' соңғы бөлігін бөлу (TaqMan Assay).

Осы әдісте полимеразаның 5'-экзонуклеаза пайдалануға негізделген. Реакциялық қоспа құрамына 5' флуоресцентті белгі және 3' флуоресценцияның сөндіргіші, 3' фосфат тобы кіретін ДНҚ - зондтар қосылады. Бұл зондтардың амплификацияланатын орынының ішінде арнайы отырғызылатын орындары бар. Абсорбер флуоресцентті затбелгіден шығарылған сәулені сіңіреді, ал 3' фосфат тобы полимеразды блоктайды.

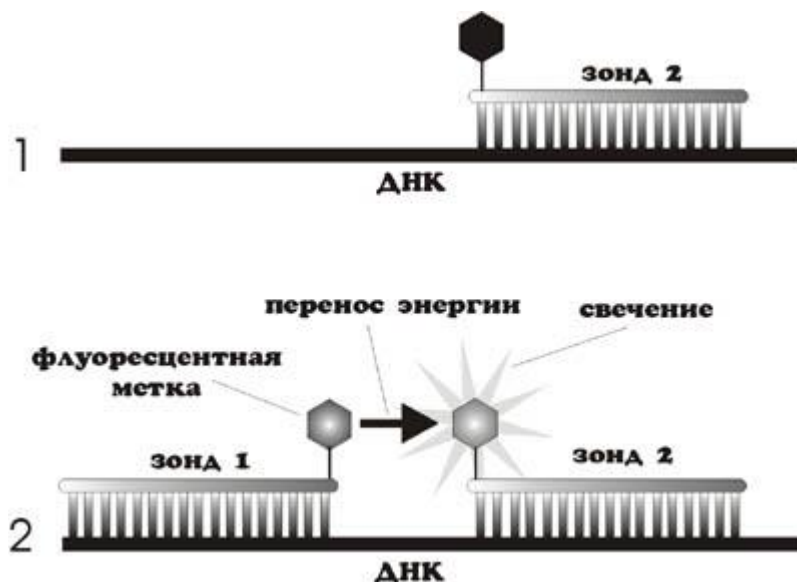


2 Сурет – 5' соңғы бөлігін бөлу

ПТР кезінде праймерлерді күйдіру кезеңінде ДНҚ-зондтың ДНҚ комплементарлық тізбегіне қосылуы жүзеге асады, ПТР барсында амплификация өнімдері көп болған сайын, зондтың молекулалары соғұрлым нақты өзіне тиісті ампликондармен байланыстырылады. Полимераздың элонгация кезеңінде ДНҚ комплементарлы тізбегін синтездейді, зондқа жеткенде 5'-экзонуклеаза болуына байланысты оны ажыратыла бастайды. Содан флуоресцентті белгі мен сөндіргіш ажыратылады, ол детекторлы жарықтың ұлғаюына алып келеді [16].

2. Энергияның резонанстық тасымалдауы бар 2 зондтарды қолдану (LightCycler assay).

Флуоресценцияның артуы ампликондармен комплементарлы байланысу кезінде бірден 2 ДНҚ зондтардың ампликондарымен жүреді. Әдістің принципі зондтың 3` соңындағы бір флуорофордан екінші зондтың 5` соңындағы екінші флуорофорға энергияны тасымалдау және флуорофорлар арасындағы ара қашықтық 1-3 нуклеотидтен тұрады [17].



3 Сурет – Энергияның резонанстық тасымалдауы бар 2 зондтарды қолдану

2 зондтарды ДНҚ матрицамен бір уақытта байланыстырғанда бірінші флуорофор шығаратын сәуле екінші флуорофорға беріледі, оның сәулеленуі құрылғымен детектеледі. Осылайша анализдің ерекшелігі еселенеді [17].

2 МАТЕРИАЛДАР МЕН ӘДІСТЕР

2.1 Зерттеу нысаны

Қазақстан және Жапон инновациялық орталығындағы ғылыми-диагностикалық зертханасында нақты уақытты полимеразды тізбек реакция (ПТР) әдісі арқылы азық-түлік (ірімшік, конфет) өнімдерінің құрамында 35S арнайы ДНҚ промоторы мен NOS терминаторының құрамына зерттеулер жүргізілді.

NOS терминаторы сояның 40-3-2 желісінің геномында болады. NOS терминаторы сояның А-2704-12, А-5547-127 желісіндегілерің геномында жоқ.

Зерттеулер ҚХА 1346-2005 Биологиялық қауіпсіздікті сақтау бойынша жүргізілді. Сынамаларды іріктеу ұлттық стандарттар бойынша жүргізілді.

Зерттеу нысандары тағам өнімдері болды. Голландиялық ірімшік (Диканька), конфет (Milky Way) өнімдер құрамында кездесетін соя өсімдігінің ДНҚ геномына зерттеу жүргізілді. Зерттеулер жүргізу кезінде ДНҚ бөлу үшін азық-түлік өнімдерінен *Soya 356043 GMO standart set ERM-BF 425, Fluka USA* жиынтығы қолданылды.

Бұл жиынтық ДНҚ тікелей пропорционалды мөлшерде бөлуге мүмкіндік береді.

Геномдық ДНҚ бөлу хаттама бойынша жүргізіледі. Азық-түлік өнімдерінен ДНҚ бөлу әдістемесі лизирлеуші буфердегі жасушалардың лизисі, ерітіндіден ферментативті реакция тежегіштерінің сорбциясы және ДНҚ тұндыру үшін тиімділігі жоғары буфердің көмегімен ерітіндіден ДНҚ тұндырудан тұрады.

ПРТ нақты уақытта қолданылатын құрылғы 3 блоктан тұрады: амплификатор (термиялық блок), флуоресцентті детектор мен компьютер.

Термиялық блок 96 түрлі сынама, стандартты форматтағы мөлдір пробиркалар немесе микропланшеттерге арналған. Флуоресцентті сигналды тіркеу бәрінде бір уақытта жүргізіледі. Нәтиже деректері әр сынама үшін компьютер экранына шығарылады. Зертханалық талдау соңында график автоматты түрде құрылады, зерттелетін материал мазмұны сынамаларда есептеледі.



4 Сурет – Нақты уақыттағы ПТР Real Time Step ne Plus (Германия) аппараты

2.2 ПТР анализ реакциялар кезеңдері

ПТР анализ Real Time Step ne Plus (Германия) аппараты бойынша жүргізіледі. Осы зерттеулер кезінде үш тәуелсіз реакция өтеді. Бір реакция соя вирусының 35S ДНҚ фрагментін анықтауға мүмкіндік береді, ол барлық өсірілетін ГМ өсімдіктер құрамында кездеседі. Екінші реакция – NOS терминаторының *Agrobacterium tumefaciens* T1 плазмидінің ДНҚ фрагментін анықтауға мүмкіндік береді, ол көбінесе өнеркәсіпте өсірілетін ГМ өсімдіктерде кездеседі. Бірінші немесе екінші реакцияның оң көрсеткіш көрсетуі өсімдіктердің ГМ екенін дәлелдейді. Үшінші реакция – ішкі бақылау реакциясы, ол жалған теріс қорытындылар болмауына мүмкіндік береді. Осы үш реакцияның жүруі флуоресцентті бояғышпен белгіленген зонд арқылы детектеледі. 35S промотор үшін ROX бояғышымен, NOS терминаторын анықтау үшін FAM бояғышымен, ал ішкі бақылау реакциясы (ВПК) үшін Cy5 бояғышымен белгіленген зондтар пайдаланылады.

2.3 Қажетті реактивтер жиынтығы және құрылғылар

2 Кесте – Өсімдік шикізаты мен азық-түлік өнімдерінен ДНҚ бөлуге арналған реактивтер жиынтығы

Аты	Сипаттама	Саны
1	2	3
Реактив №2	Лизирлеуші буфер, 40 мл	1
Реактив №3	Протеиназа К, 0,9 мл	1
Реактив №4	Хлороформ, 30 мл	1

1	2	3
Реактив №5А	Тұндырғыш ерітінді, 30 мл	1
Реактив №5Б	Сорбент, 1,4 мл	1
Реактив №6	Жуу ерітіндісі А, 25 мл	1
Реактив №7	Жуу ерітіндісі Б, 25 мл	1
Реактив №8	Жуу ерітіндісі В, 25 мл	1
Реактив №9	ТЕ-буфер, 6 мл	1

Жеткізу және сақтау шарттары. Реактивтер жиынтығы салқындатқышсыз жеткізіледі және одан ары сақтау шарттарға сәйкес сақталады. №2, 4-9 реактивтері үшін сақтау температурасы +4...+8 °С, №3 реактиві үшін -18...-20 °С, 12 ай сақталады.

Қосымша құрылғылар:

1. Микропробиркаларға арналған жоғары жылдамдықтағы центрифуга.
2. Көлемі 1,5 немесе 2,0 мл микропробиркалар.
3. 1000, 200 және 20 мкл ауыспалы көлемді микропипеткалар.
4. Көлемі 2,0 мл пробиркаларға арналған штатив.
5. Термостат.
6. «Vortex» типті шейкер.
7. Шпатель.
8. Таразы.

2.4 Зерттеу кезеңдері және әдістер

Өсімдік тектес тамақ өнімдеріндегі ГМО-ның сапалық және сандық анықтау кезеңдері:

- зерттелетін өнімнен ДНҚ бөліп алу;
- нақты уақытта ПТР жүргізу;
- алынған қорынтыларды аппараттың бағдарламалық қамтамасыз ету көмегімен талдау;
- Excel бағдарламасының көмегімен қорытындыларды өңдеу және құжаттау.

2.4.1 ДНҚ бөліп алу әдісі

Алдымен алынған соядан осы тәсілдермен ДНҚ бөліп аламыз:

- К протеиназасын қоспағанда «өсімдік шикізаты мен тамақ өнімдерінен ДНҚ бөлуге арналған реактивтер жиынтығының» барлық компоненттері алдын ала бөлме температурасына дейін жеткізіледі, лизирлеуші және тұндыратын А буферін тұнба толық ерігенге дейін қарқынды түрде араластырылады. Қарқынды түрде араластыру көбіктің пайда болуына әкеледі.

- Сынамаларды көлемі 1,5 мл және 2,0 мл микроцентрифугалық пробиркаларға орналастырдық.

- Әрбір пробиркаға 300 мкл су құйып, қоспаны шейкермен немесе шыны таяқшамен мұқият араластырамыз.

- Әрбір пробиркаға 500 мкл экстракциялық буфер мен 5 мкл протеиназа К енгіземіз, қоспаны мұқият араластырамыз. Протеиназа К тоңазытқыштан тек қолданар кезде шығарып, қолданғаннан кейін бірден тоңазытқышқа салу қажет.

- Қоспаны 56°C температурада 60 минут инкубациялап, шейкерде қарқынды түрде араластырамыз. Бөлме температурасына дейін суытып, 10 минут бойы 16000 айн./мин (10000-12000g) центрифугалаймыз.

- Тұндырылған сұйықтықтың 300-500 мкл. Тұнба мен май тамшысына тигізбей, абайлап тұнба сұйықтығының 300-500 мкл көлемін дозатор көмегімен жаңа пробиркаға ауыстырамыз. 500 мкл хлорофром қосып, шейкерде 30 секунд қарқынды араластырамыз. 10 минут 16000 айн./мин (10000-12000g) центрифугалаймыз.

- Хлорофром қабаты мен фаза аралық қабатты қамтымай, жоғары беткі қабатын дозаторды қолданып басқа таза пробиркаға ауыстырамыз. 500 мкл хлорофром қосып, шейкерде 30 секунд қарқынды араластырамыз. 5 минут суспензияны 16000 айн./мин (10000-12000g) центрифугалаймыз.

- Хлорофром қабаты мен фаза аралық қабатты қамтымай, жоғары беткі қабатын дозаторды қолданып басқа таза пробиркаға ауыстырамыз. Әрбір пробиркаға екі есе көлемінде тұндырғыш ерітінді А қосамыз. Пробирканы айналдырып, қоспаны араластырамыз. Қарқынды араластыру көбіктің пайда болуына әкеледі.

- Бөлме температурасында 60 минут қоспаны инкубациялаймыз. 5 минут 16000 айн./мин (10000-12000g) центрифугалаймыз.

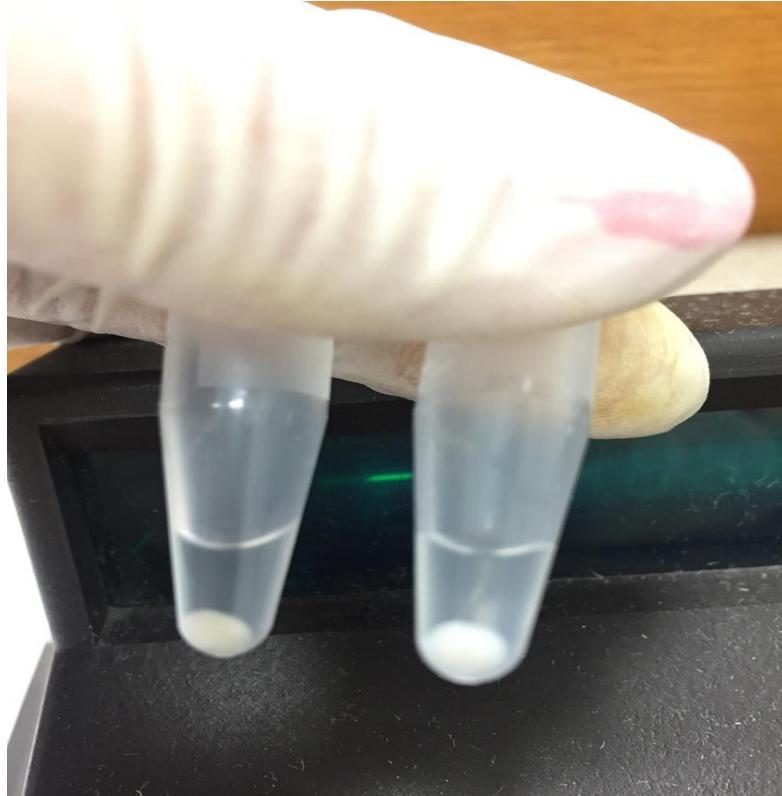
- Шөгінді сұйықтықты абайлап алып тастап, тұнбаның пробиркада қалуын қадағалаймыз. Тұнбаны 350 мкл тұз ерітіндісінде ерітеміз және тұнбаны жақсылап еріту үшін 56°C температурада бірнеше минут жылытуға болады.

- Тұнба толық ерігіннен кейін 350 мкл хлорофром қосып, шейкерде 30 секунд араластырамыз. 5 минут 16000 айн./мин (10000-12000g) центрифугалаймыз.

- Хлорофром қабаты мен фаза аралық қабатты қамтымай, жоғары беткі қабатын дозаторды қолданып басқа таза пробиркаға ауыстырамыз. Әрбір пробиркаға екі есе көлемінде тұндырғыш ерітінді Б қосамыз. Пробирканы айналдырып, қоспаны араластырамыз. 10 минут 16000 айн./мин (10000-12000g) центрифугалаймыз.

- Шөгінді сұйықтықты абайлап алып тастаймыз. Тұнбаға 500 мкл жуу ерітіндісін қосамыз. Тұнбаны бұзбай шейкерде орташа жылдамдық айналыммен араластырамыз. 10 минут 16000 айн./мин (10000-12000g) центрифугалаймыз.

- Шөгінді сұйықтығын мұқият алып тастаймыз. Сұйықтық толық буланғанға дейін ашық қапакты пробиркаларда қалдырамыз.



5 Сурет – Бөлініп алынған ДНҚ

- Тұнбаны 100 мкл ТЕ-буферінде ерітеміз. ДНҚ ерітіндісін -20 °С сақтау қажет.

2.5 ГМО сапалық анықтау

- ДНҚ бөліп алу кезіндегі реакциялық қоспасы бар пробиркалар аламыз.
- Реакциялық қоспаны ерітіп, одан кейін 30-60 секунд центрифугалаймыз (ротордың айналу жылдамдығы 4000 айн./мин немесе 2500g).
- Пробиркаларды таңбалаймыз. Кейбір пробирка қақпағы арқылы өлшеу кезінде таңба пробирка сыртына белгіленеді, ал пробирка сырты арқылы өлшеу кезінде таңба пробирка қақпағына белгіленеді.
- Оң нәтиже сынамасы (ОНС) ДНҚ ГМО, бөлінуі теріс нәтиже сынамасы (ТНС) және зерттелетін сынамаларды еріту, шейкерде араластыру, центрифугалау.
- Реакциялық қоспасы бар пробиркаға 2 мкл-ден бөлінуі теріс нәтиже сынамасын және зерттелетін сынамаларды, соңында екі рет өсімдіктің ДНҚ ГМ оң нәтиже сынамасын дозаторды пайдалана отырып, бірнеше рет тамызумен араластырып, қақпағын тығыз жабамыз. Қоспада ауа көпіршіктерінің қалмауына көңіл бөлеміз. Ал егер көпіршіктер пайда болса 3-5 секунд центрифугалау қажет.

- Пробиркаларды амплификаторға кестеде келтірілген тәртіпте орналастырамыз.



6 Сурет – Сынамаларды аппаратқа орналастыру

3 Кесте – Талдау жүргізу кезінде үлгілерді зерттеу тәртібі

№	Сынама түрлері
1	ОНС
2	ОНС
3	ТНС
4	ТНС
5	Зерттеу сынамасы 1
6	Зерттеу сынамасы 1
7	Зерттеу сынамасы 2
8	Зерттеу сынамасы 2
9	Зерттеу сынамасы 3
10	Зерттеу сынамасы 3

- Амплификация бағдарламасын орнату (4-кесте), канал детекцияларын таңдау (5-кесте) және аппаратты нұсқаулыққа сәйкес іске қосу.

4 Кесте – Амплификация бағдарламасы

Кезеңдер №	Температура °С	Уақыт	Цикл саны	Оптика
1	95	10 минут	1	
2	95	20 секунд	50	

	60	50 секунд		Қосылу
3	25	Сақтау		

5 Кесте – Детекция каналдары

Реакция	Бояу	Жұтылу/шығу толқынының ұзындығы	Өлшеу үшін қолайлы аспап канал
NOS терминатор	FAM	494/518	FAM, SYBR Green I
35S промотор	ROX	580/605	ROX, Tx, Red
ВПК	Cy5	635/670	Cy5

- ПТР анализ Real Time Step ne Plus аппарат бағдарламалары бойынша үш бояғыш – FAM (NOS-терминатор), ROX (35S-промотор) және Cy5 (ВПК) үшін жүргізілген реакцияның нәтежиерін алу.

2.6 ГМО сандық анықтау

Өсімдіктен алынған ГМО сандық анықтамасы мәні өсімдіктің ГМ ДНК санының пайызда график бойынша көрсетілуі, талданатын өсімдіктің ДНК жалпы санына қатынасын есептеуге негізделген. ГМО сандық анықтау үшін бір пробиркада бір мезгілде екі тәуелсіз реакция жүргізіледі. Бір реакция ДНК талданатын өсімдікті (соя) анықтауға мүмкіндік береді. Басқа реакция өсімдіктің ГМ нақты сызығына тән график анықтауға мүмкіндік береді. Әрбір реакцияның өтуі арнайы зонд арқылы анықталады. Талданатын объектінің ДНК (соя) анықтау үшін R6G бояғыш, ал генетикалық ендірмені анықтау үшін – прибордың түріне байланысты FAM немесе ROX бояғышын пайдаланады.

ГМО-ның пайыздық құрамын анықтау калибрлеу үлгілерін (КО) қолдана отырып жүргізіледі, олар белгілі бір пайыздық қатынаста жабайы типті өсімдіктің ДНК қоспасын (0% ГМО) және ДНК ГМ желісін (100% ГМО) білдіреді.

- Реактивтер дайын түрде көлемі 0,2 мл ПТР пробиркаларға енгізіледі және тек ДНК сынамасын енгізуді талап етеді.

- ГМО сандық анализі үшін тест-жүйелерден реакциялық қоспасы бар пробиркалардың қажетті санын алу. Пробиркалардағы қоспаны ерітуге және қайта мұздатуға болмайды.

- Реакциялық қоспаны ерітіп алғаннан кейін пробиркаларды 30-60 секунд центрифугалау қажет (ротордың айналу жылдамдығы 4000 айн./мин немесе 2500g).

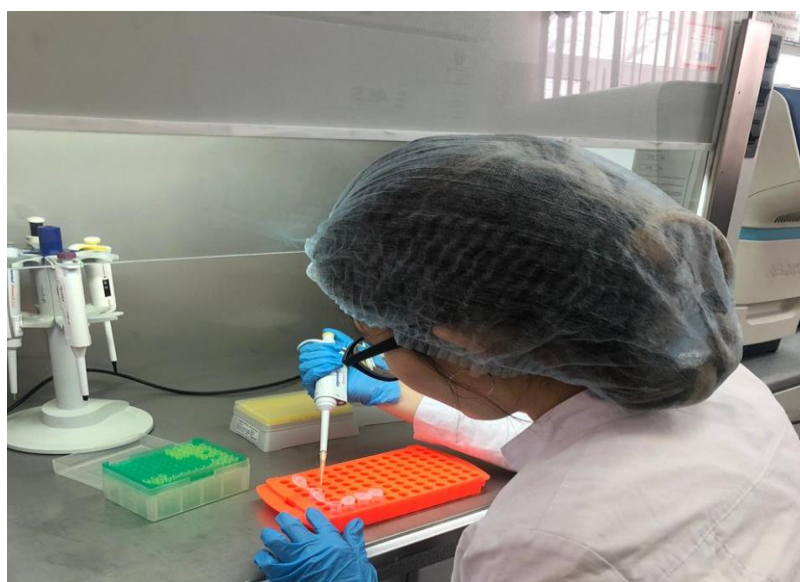
- Пробиркаларды таңбалау. Өлшеуді пробирканың қақпағы арқылы жүргізетін аспаптар үшін таңбалауды пробирканың қабырғасына; пробирканың қабырғасы арқылы өлшеуді жүргізетін аспаптар үшін – қақпаққа таңба салу.



7 Сурет – Таңбалау

- Калибрлеу үлгілері (КО) ДНК ГМО және зерттелетін үлгілерді еріту, сілкілегіште араластыру және центрифугалау.

- Зерттелетін үлгілердің 2 мкл-ден пробиркаларға енгізу және соңғы кезекте, дазаторды пайдалана отырып, тамшылатумен араластыру (5-10 рет) және қақпақты тығыз жабу. Қоспада ауа көпіршіктер қалмауын бақылау. Көпіршік қалған жағдайда 3-5 сек центрифугалау қажет.



8 Сурет – Дозаторды пайдалана отырып, тамшылатумен араластыру

- Пробиркаларды 6-кестеде келтірілген тәртіппен амплификаторға орналастыру қажет.

6 Кесте – Сандық талдау кезінде үлгілердің жүру тәртібі

№	Үлгілердің түрі
1	КО 0,5%
2	КО 0,5%
3	КО 1%
4	КО 1%
5	КО 2%
6	КО 2%
7	КО 5%
8	КО 5%
9	Зерттелетін сынама 1
10	Зерттелетін сынама 1
11	Зерттелетін сынама 2
12	Зерттелетін сынама 2
13	Зерттелетін сынама 3
14	Зерттелетін сынама 3

- Амплификация бағдарламасын орнату (7-кесте), тиісті мәтін арналарын таңдау (8-кесте) және құралды нұсқаулыққа сәйкес іске қосу.

7 Кесте – ГМ соя GTS 40-3-2 сандық талдау үшін амплификация бағдарламасы

№ Цикл	Температура °С	Уақыт	Цикл саны	Оптика
1	95	10 минут	1	
2	95	20 секунд	50	
	60	50 секунд		қосылу
3	25	Сақтау		

8 Кесте – Детекция каналдары

Реакция	Бояу	Жұтылу/шығу толқынының ұзындығы	Өлшеу үшін қолайлы аспап канал
Соя	R6G	520/550	R6G, JOE, HEX, TET
ГМ	FAM немесе ROX	490/520	FAM, SYBR, Green I
		580/605	ROX, Tx, Red

- St кинетикалық қисықтардың (график) шекті циклдарының мәнін есептеу және Excel сақтау (9-сурет).



9 Сурет – Нәтежиелерін қорытындылау, сақтау

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ

3.1 ГМО сапалық анықтау нәтижелері

Эксперимент нәтижесі оң нәтижелі сынама (ОНС), теріс нәтижелі сынама (ТНС) және зерттелетін сынамалардағы ГМО ДНҚ-ны сапалық анықтау болып табылады.

9 Кесте – ГМО сапалық анықтаудың нәтижелерін автоматты талдау

№	Аты	NOS	35S	ВПК	Ct(FAM)	Ct(ROX)	Ct(Cy5)
1	ОНС	33,02	34,75		33,69	35,06	>50,00
2	ОНС				32,35	34,44	>50,00
3	ТНС	-	-	31,15	>50,00	>50,00	30,75
4	ТНС	-	-		>50,00	>50,00	31,56
5	СЫНАМА 1	+	+	+	28,43	30,14	30,98
6	1	+	+	+	28,47	30,5	30,45
7	СЫНАМА 2	+	+	-	28,69	30,93	>50,00
8	2	+	+	-	28,84	31,27	>50,00
9	СЫНАМА 3	+	-	+	28,43	>50,00	29,85
10	3	+	-	+	28,47	>50,00	29,79
11	СЫНАМА 4	+	-	-	28,43	>50,00	>50,00
12	4	+	-	-	28,47	>50,00	>50,00
13	СЫНАМА 5	-	-	+	>50,00	>50,00	29,85
14	5	-	-	+	>50,00	40,19	29,79
15	СЫНАМА 6	-	-	-	37,97	39,67	>50,00
16	6	-	-	-	>50,00	>50,00	>50,00

Алынған нәтижелердің дұрыстығы төмендегі барлық шарттарға сәйкес келуі керек:

- Оң нәтижелі сынама (ОНС) NOS-терминатор үшін шекті цикл

$$(Ct \text{ FAM}) < 37;$$

- Оң нәтижелі сынама (ОНС) 35S-промотор үшін шекті цикл

$$(Ct \text{ ROX}) < 37;$$

- Теріс нәтиже сынаманың (ТНС) теріс нәтижелері, ТНС-дегі ішкі оң бақылау үшін шекті цикл

$$(Ct \text{ Cy5}) < 37.$$

ТНС-да ГМО табылған жағдайда барлық сынамаларды талдау нәтижесін дұрыс деп санауға болмайды. Сынамаларды талдауды қайталау талап етіледі.

Зерттелетін үлгілердегі ДНҚ 35S-промоторды және NOS-терминаторды анықтау зерттелетін үлгілерді және 100 көшірме/мкл ДНҚ 35S-промоторы және NOS-терминаторы бар ОНС салыстыру жолымен автоматты түрде жүргізіледі. Талдау нәтижелерін түсіндіруді 10-кестеге сәйкес жүргізу керек.

10 Кесте – Талдау нәтижелерін түсіндіру

ПЦР нәтижесі			Талдау
NOS	35S	ВПК	
+	-	+	NOS-терминатор анықталды
+	-	-	
-	+	+	35S-промотор анықталды
-	+	-	
+	+	+	35S-промотор және NOS-терминатор анықталды
+	+	-	
-	-	+	35S-промотор және NOS-терминатор анықталған жоқ
-	-	-	Жалған теріс нәтиже, сынамада ПТР тежегіштері бар. Сынаманы 5 рет ТЕ-буфермен (ДНК бөлуге арналған жиынтықтан №9 Реактив) араластыру және анықтауды қайталау қажет.

3.2 ГМО сандық анықтау нәтижелері

Эксперименттің нәтижесі график түзуін құру, оның параметрлерін есептеу және зерттелетін сынамаларда ГМО пайыздық құрамын анықтау болып табылады.

Салынған калибрлеу түзудің дұрыстығының өлшемі төменде көрсетілген барлық шарттарды орындау болып табылады:

- R^2 корреляция коэффициенті 0,97 (кестедегі калибрлеу түзудің параметрлері);

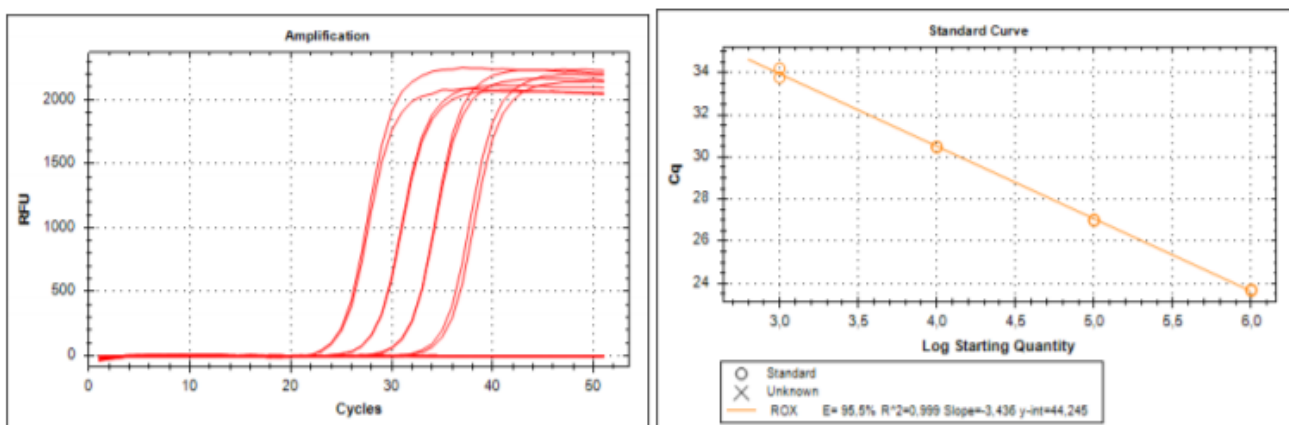
- калибрлеу түзуінің А коэффициенті 0,25-тен 0,35-ке дейінгі диапазонда болу қажет.

ПЦР әдісінде нақты уақытта шекті цикл (Ct) флуоресценттік сигнал үшінші және он бесінші цикл арасында өлшенетін флуоресценттік

сигналдардың орташа мәніне жететін цикл ретінде эксперименталды түрде анықталады, оған қоса он стандартты ауытқулар қосылады.

Соя генінің амплификация реакциясының параметрлерін анықтау үшін соя ДНҚ сынамасымен ПТР нақты уақыт әдісімен екі рет қайталаумен жұмыс жүгізілді. Реакция тиімділігі 98,1% құрады, кинетикалық қисықтың коэффициенті $A=3,368$, сандық көрсеткіш коэффициенті $R^2=0,996$.

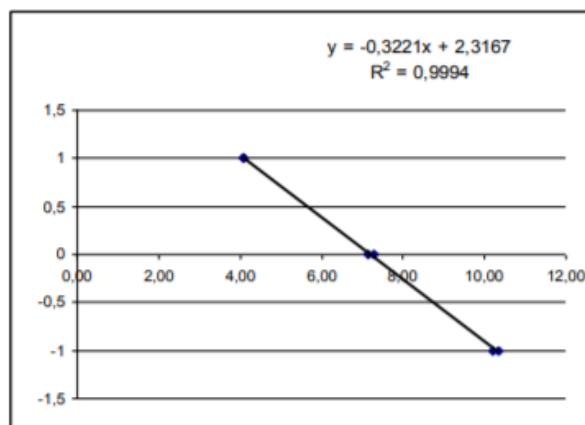
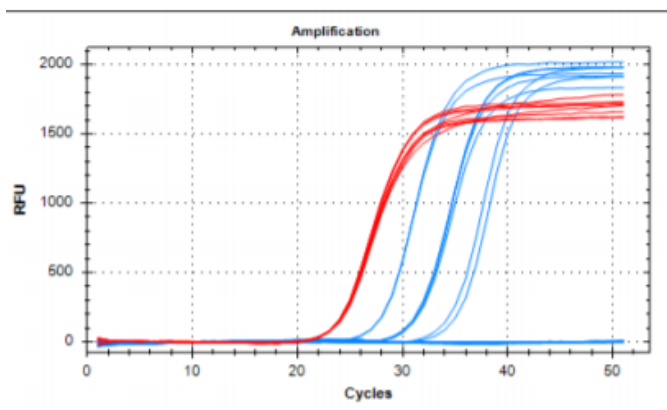
Алынған кинетикалық қисықтар және олар бойынша есептелген калибрлеу қисығы 10-суретте келтірілген.



10 Сурет – ПТР нақты уақыттағы сояның GTS 40-3-2 типінің ПТР нақты уақыт анализі (R6G детекция каналы)

ПТР нақты уақыт әдісімен сынамадағы ГМО құрамын сандық анықтау ГМО үшін ерекше тізбектердің мазмұнын қалыпқа келтіру жолымен және праймер-зонд пайдаланумен анықталады.

Сояының пайыздық құрамын анықтау GTS 40-3-2 Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Бельгия) өндірісінің стандартты калибрлеу үлгілері негізінде калибраторларды қолдану арқылы жүргізілді, ол жабайы түрдегі соя (0% ГМО) және соя ГМО құрамын (100% ГМО) пайыздық мөлшерін көрсетеді. Калибрлеу түзудің (11-сурет) көмегімен талданатындағы ГМ соя ДНҚ пайыздық мөлшері есептеледі.



11 Сурет – Сол жақта – GTS 40-3-2 соя желісінің ДНҚ құрамына сынамалардың кинетикалық қисық амплификациясы. Оң жақта – калибрлеу қисығы R²-0,9994, ПТР нақты уақыт әдіс тиімділігі 96,9%.

Зерттелетін сынамалар үшін алынған нәтижелер зерттелетін өсімдіктің ДНҚ-ның талдау үшін жеткілікті саны бөлінген жағдайда ғана дұрыс деп саналады. ГМО сандық анықтау нәтижесінде зерттеліп отырған өсімдік тектек тамақ өнімі сояның ДНҚ-сында гендік модифицирленген организмдер көрсеткіші 0,9% аспады. Бұл «Тұтынушылардың құқықтарын қорғау туралы» Қазақстан Республикасының Заңына сәйкес келеді және биологиялық қауіпсіздігі туралы заңды сақтайды.

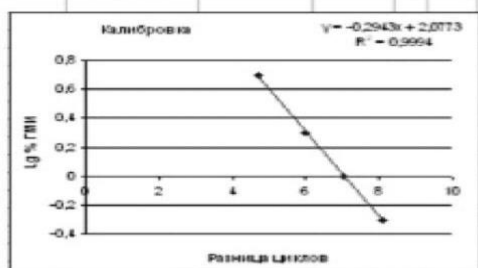
Определение процентного содержания ГМ сои Roundup Ready

№	Название	% ГМИ	ст откл	% Ig %	Ct (R6G)	Ct (ROX)	Разн	Сред	Примечания
1	КО 0.5%			0,5 -0,3	25,49	33,68	8,19	8,105	
2	КО 0.5%			0,5 -0,3	25,34	33,36	8,02		
3	КО 1%			1 0	25,37	32,37	7	7,05	
4	КО 1%			1 0	25,43	32,53	7,1		
5	КО 2%			2 0,3	25,59	31,61	6,02	5,99	
6	КО 2%			2 0,3	25,85	31,81	5,96		
7	КО 5%			5 0,7	25,64	30,36	4,72	4,715	
8	КО 5%			5 0,7	25,45	30,16	4,71		
9	ОБРАЗЕЦ 1	0,00		1,9	21,45	22,17	0,72		
10	Соя 1			0 1,9	21,66	22,24	0,58		
11	ОБРАЗЕЦ 2	0,00	0,00	0 -292	23,98	>50,00	1000		
12	Соя 2			0 -292	24,06	>50,00	1000		
13	ОБРАЗЕЦ 3	0,96	0,00	1 -0	22,11	29,23	7,12		
14	Соя 3			1 -0	22,31	29,42	7,11		

Уравнение калибровочной прямой $y = Ax + B$

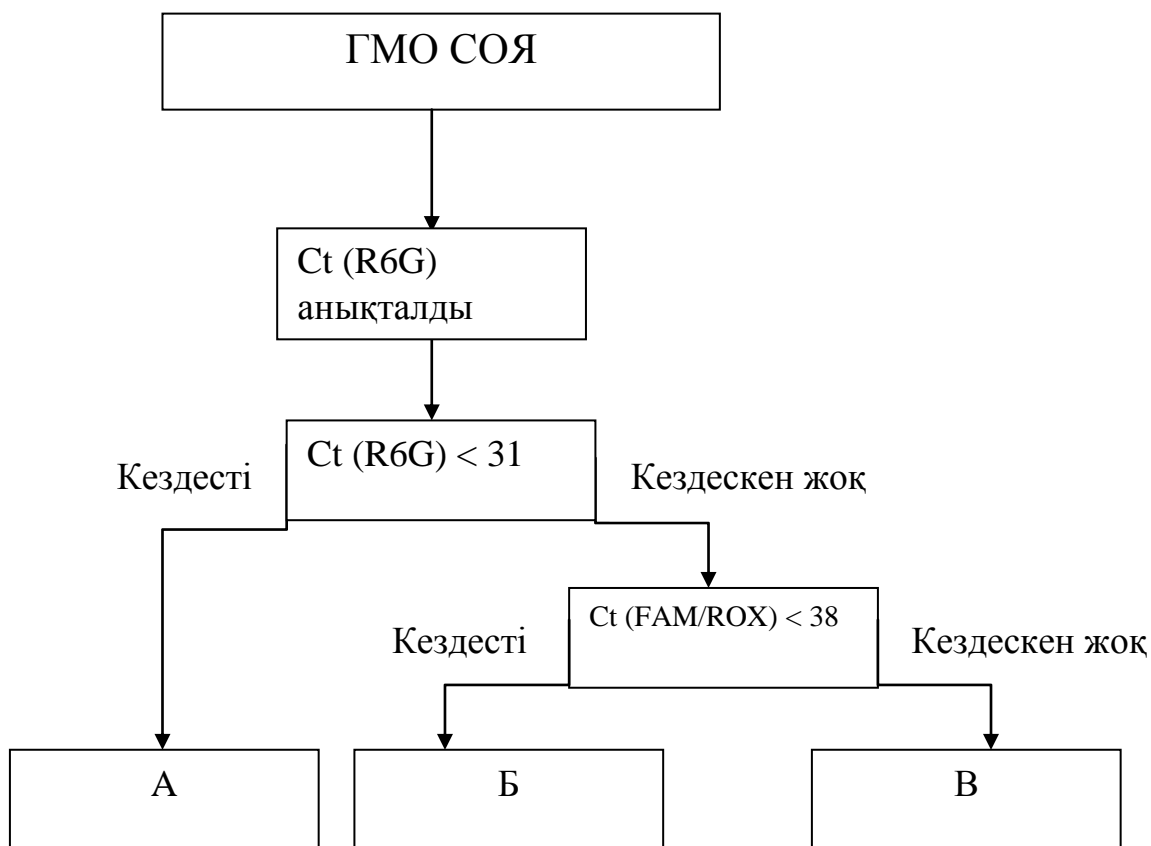
A = -0,2943

B = 2,0773



12 Сурет – Соя ГМ сандық анықтаудың нәтижелерін автоматты талдау

Нәтежиелерді талдау. Зерттелетін үлгілер үшін алынған нәтижелер зерттелетін өсімдіктің ДНҚ-ның талдау үшін жеткілікті саны бөлінген жағдайда ғана дұрыс деп есептеледі. Алынған нәтижелердің дұрыстығын талдау сызба бойынша жүргізіледі:



А жағдайы: ГМО-ның кез келген пайыздық құрамын анықтау үшін ДНҚ-ның жеткілікті саны бөлінді. Есептеу нәтижелері қабылданады.

Б жағдайы: сынамалар ГМО пайызын дәл есептеу үшін ДНҚ мөлшері жеткіліксіз. Есептеу нәтижелері шамамен есептеледі және ГМО-ның үлкен құрамы анықталған жағдайда ғана қабылданады (> 10%). Дәлірек деректерді алу үшін 5 мкл сынаманы алып, амплификацияны қайталау немесе сынамадан ДНҚ қайта бөлу қажет.

В жағдайы: сынамаларда ГМО пайызын дәл анықтау үшін ДНҚ мөлшері жеткіліксіз. Есептеу нәтижелері дұрыс емес деп есептеледі. Дәлірек деректерді алу үшін 5 мкл үлгіні алып, амплификацияны қайталау немесе сынамалардан ДНҚ қайта бөлу қажет.

ҚОРЫТЫНДЫ

1 Өсімдік тектес азық-түлік өнімдер құрамындағы ГМО анықтау бойынша және ГМО қойылатын шектеулермен, ГМО оқшаулау жайлы әдебиеттік шолу жасаланды. ГМО азық-түлік өнімдерінің әсері және зияны, алдын-алу жолдары жайлы мәліметтер жазылды. ГМО өнімдерін алуда, пайдалануда қойылатын заңдар жайлы шолу жасаланды.

2 Голландиялық ірімшік (Диканька), конфет (Milky Way) өнімдері құрамында кездесетін соя өсімдігінің геномын зерттеуге материалдар мен қажетті құрал жабдықтар жинағын дайындап, қолданылатын әдістерге анализ жасалынды. ГМО сапалық және сандық анықтау жұмыстары жасалды.

3 ГМО сапалық және сандық анықтау жұмыстары бойынша нәтежиелерін сақтау және алу жасалынды. Нәтежиесінде ірімшік (Диканька), конфет (Milky Way) өнімдернің құрамында кездесетін соя өсімдігінің ДНҚ-сында ГМ өнімдер кездесті бірақ ГМО сандық анықтау кезінде пайыздық көрсеткіші 0,9% -дан аспады.

ҚЫСҚАРТЫЛҒАН СӨЗДЕР ТІЗІМІ

- БҰҰ – Біріккен Ұлттар Ұйымы
- ВПК – Ішкі бақылау реакциясы
- ГМ – Гендік модификация
- ГМО – Гендік модификацияланған организм
- ДНҚ – Дезоксирибонуклеин қышқылы
- КО – Калибрлеу үлгілері
- ОНС – Оң нәтижелі сынама
- ПТР – Полимер тізбекті реакция
- ТНС – Теріс нәтижелі сынама

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Кверчи М., Джермини М., Ван ден Эде Г. Анализ образцов пищевых продуктов, на присутствие генетически модифицированных организмов. Практическое руководство, 2016. С. 9-10.
- 2 Уолкер Ш. Биотехнология без тайн. М.: ЭКСМО, 2008. С. 336.
- 3 Соколов М.С., Марченко А.И. Потенциальный риск возделывания трансгенных растений и потребления их урожая // Сельскохозяйственная биология, №5, 2002. С. 3-23.
- 4 Сенькин Н.И. Перспективы развития генетически модифицированных культур - 2017. - С 6.
- 5 Технический регламент «Требования к безопасности пищевой продукции, полученной из генно-модифицированных (трансгенных) растений и животных», Постановление Правительства Республики Казахстан от 21 сентября 2010 года.
- 6 Закон Республики Казахстана от 4 мая 2010 года № 274-IV «О защите прав потребителей».
- 7 Қазақстан Республикасының «Тамақ өнімдерінің қауіпсіздігі туралы» 2007 жылғы 21 шілдедегі №301 Заңы // Параграф ақпараттық құқықтық жүйесі 2012ж.
- 8 Аубакиров Х.Ә., Сұлтанов А.А., Сүлеймен Е.М., Тлепов А.Ә. Ауыл шаруашылық биотехнологиясы. // - Алматы: 2013. С. 8-10.
- 9 James, C. Отчет ISAA № 34-2005. Площади трансгенных (ГМ) культур в мире. - 2005. - С 11.
- 10 Quist, D. Transgenic DNA Introgressed into Traditional Maize Landraces in Oaxaca Mexico / D. Quist, I. Chapela // Nature 414, 6863, November 29, 2001. - P. 541-543.
- 11 Ершимин А.П. Генетически модифицированные организмы. Мифы и реальность / А.П. Ершимин - Минск, 2004. С. 100.
- 12 Ермакова И.В. Трансгенизация - новый век эволюции или генная бомба? // Эвол. 2005. № 2. С. 34-39.
- 13 Бердығалиев А.Б., Хасенова Г., Ушанская Е.Ю., Кайнарбаева М.С., Рыстығулова Ж.Б. Анализ потребительных реакций на информацию о содержании генетических модифицированных организмов в пищевых продуктах №1-2015.
- 14 Wang, X-R., Tsumura, Y., Yishimaru, H., Nagasaka, K., Szmidt, A.E. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcl*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *tmV* intron sequences // American Journal of Botany, 1999. V.86. P. 3-4.
- 15 Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction // Erlich Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 1986. 51:263-267.
- 16 Heid C.A. Real-time quantitative PCR. // Genome Res.-1996.-№ 6.-p. 986-994.

17 Bernard P.S., Pritham G.H., Wittwer C.T. Color multiplexing hybridization probes using the apolipoprotein E locus as a model system for genotyping. //Analytical Biochemistry.-1999. - № 273.- p. 221-228.