

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Калининградский государственный технический университет»

**Е. В. Лютова**

**ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

**Учебно-методическое пособие по лабораторным работам  
для студентов магистратуры по направлению подготовки  
19.04.01 – Биотехнология**

Калининград  
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»  
2021

УДК 577.21

РЕЦЕНЗЕНТ

доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой пищевой биотехнологии ФГБОУ  
ВО «Калининградский государственный технический университет»  
О. Я. Мезенова

**Лютова, Е. В.**

Генная инженерия в пищевой промышленности: учебно-методическое пособие по лабораторным работам / Е. В. Лютова – Калининград: Издательство ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», 2021. – 35 с.

Настоящее учебно-методическое пособие содержит описание методов качественного и количественного определения ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием тест-систем и специализированного оборудования. Описаны методы, направленные на выявление регуляторных последовательностей (промотора 35S вируса мозаики цветной капусты и терминатора NOS *Agrobacterium tumefaciens*), последовательностей ДНК, характерных для сои и кукурузы, а также определения соотношения промотора 35S и ДНК сои, соотношения промотора 35S и ДНК кукурузы. Данные методы могут применяться при контроле растительного сырья и продуктов питания на наличие генетически модифицированных организмов. Также они применяются для санитарно-эпидемиологической экспертизы, государственной регистрации, закупки, ввоза в Российскую Федерацию и реализации пищевых продуктов. Пособие содержит описание основных методов выделения ДНК из растительного и животного сырья.

Рис. 5, табл. 3, список лит. – 8 наименований

Учебно-методическое пособие рекомендовано к изданию методической комиссией механико-технологического факультета ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 25 февраля 2021 г., протокол № 7.

Учебно-методическое пособие рассмотрено и одобрено кафедрой пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 25 декабря 2020 г., протокол № 12.

УДК 577.21

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет», 2021 г.  
© Лютова Е.В., 2021 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Лабораторная работа № 1 – Проведение ПЦР-анализа в лаборатории реального времени.....	4
Лабораторная работа № 2 – Выделение ДНК из селезёнки крупного рогатого скота и гонад рыб .....	16
Лабораторная работа № 3 – Выделение ДНК из лука репчатого.....	21
Литература .....	24
ПРИЛОЖЕНИЕ. Теоретическая часть.....	25

## **Лабораторная работа № 1 – Проведение ПЦР-анализа в лаборатории реального времени**

**Цель работы:** формирование умений и навыков выявления ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье растительного происхождения с помощью тест-систем производства, который основан на использовании полимеразной цепной реакции с детекцией результатов амплификации после завершения реакции с помощью ПЦР-детектора или в режиме «реального времени» с помощью детектирующего амплификатора.

### **Задание по лабораторной работе:**

1. Ознакомиться с устройством ПЦР-лаборатории, ее приборным оснащением и правилами работы в ней.
2. Провести сорбционный метод выделения ДНК.
3. Изучить сущность и методы постановки полимеразной цепной реакции.
4. Провести методы качественного и количественного определения ГМО с помощью ПЦР-анализа в лаборатории реального времени.

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ**

#### ***Оборудование и материалы:***

- амплификатор «Герцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология») для комплектов в формате «Flash» или детектирующий амплификатор ДТ-322 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология») для комплектов в формате «Real-time»;
- ПЦР-детектор «ДЖИН» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология») для комплектов в формате «Flash»;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65 °С;
- микроцентрифуга-вортекс;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл; пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5–20, 20–200, 200–1000 мкл;
- наконечники одноразовые вместимостью 1–20; 1–200; 100–1000 мкл;

- наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объемом 1–20 мкл;
- штативы для микропробирок на 0,2; 0,6; 1,5 мл;
- перчатки одноразовые перчатки резиновые;
- холодильник с отделениями на 2–8 оС и на (-18)–(-20) оС. ГОСТ 26678;
- весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;
- пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;
- ножницы медицинские;
- скальпели хирургические ГОСТ 21240;
- ступки фарфоровые с пестиком.

**Реактивы:**

Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала «ПРОБА-ЦТАБ», включает (на 50 образцов):

- смесь № 1, по 23 мг 5 пробирок;
- раствор № 2, 12,5 мл 1 флакон;
- раствор № 3, 12,5 мл 1 флакон;
- раствор № 4, 5 мл 1 флакон;
- раствор № 5, 25 мл 1 флакон;
- раствор № 6, 38 мл 1 флакон;
- раствор № 7, 50 мл 1 флакон;
- раствор № 8, 50 мл 1 флакон.

Тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ», «СКАН-КУКУРУЗА» включают (на 50 образцов):

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 50 пробирок;
- раствор Таq-полимеразы, по 500 мкл 1 пробирка;
- буферный раствор «ПЦР-буфер», 200 мкл 1 пробирка;
- минеральное масло, 1,0 мл 1 пробирка;
- положительный контрольный образец ДНК, 150 мкл 1 пробирка.

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды, внутренний контрольный образец ДНК. Буферный раствор «ПЦР-буфер» – включен только в тест-системы формата «Flash».

В зависимости от способа детекции результатов амплификации тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ», «СКАН-КУКУРУЗА» выпускаются в двух форматах:

- формат FLASH, предусматривающий детекцию результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора «ДЖИН» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»);

- формат Real-time, предусматривающий детекцию результатов ПЦР в ходе амплификации с использованием детектирующего амплификатора «ДТ-322» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»).

Тест-системы «КВАНТУМ-П СОЯ», «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» включают (на 50 образцов):

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 150 пробирок;

- раствор Taq-полимеразы, по 500 мкл 3 пробирки;

- минеральное масло, по 1,0 мл 3 пробирки;

- положительный контрольный образец ДНК, 100 мкл 1 пробирка;

- калибровочные стандартные образцы (5%, 1% и 0,1%), по 100 мкл 3 пробирки. Раствор физиологический (0,9%-ный NaCl) стерильный.

Часть 1. Выделение ДНК из образцов пищевых продуктов и продовольственного сырья с помощью комплекта реагентов «ПРОБАЦТАБ»

Внимание! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить *отрицательный контрольный образец*. Для этого в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, промаркированную «К-», внести 50 мкл физиологического раствора стерильного. Далее проводить про-

боподготовку в пробирке «К-», не содержащей анализируемого материала, в соответствии с инструкцией.

1. Приготовить буфер для выделения (на 10 образцов): добавить в пробирку со смесью № 1 2,5мл раствора № 2, встряхнуть на вортексе до полного растворения содержимого пробирки. Добавить 2,5 мл раствора № 3 и 1 мл раствора № 4. Перемешать на вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** Готовый буфер для выделения не подлежит хранению, его необходимо использовать в течение часа после приготовления!

2. В пластиковую пробирку емкостью 1,5 мл, содержащую 20–30 мг анализируемого материала, добавить 500 мкл буфера для выделения. Тщательно гомогенизировать образец и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3–5 сек.

3. Термостатировать пробирку в течение 5 мин при 65 °С.

4. Добавить 500 мкл раствора № 5 и тщательно встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3–5 сек.

5. Центрифугировать пробирку 10 мин при 13000 об/мин.

6. Аккуратно перенести верхнюю фазу в чистую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

7. Добавить 750 мкл раствора № 6 и перемешать, 2–3 раза аккуратно перевернув пробирку.

8. Центрифугировать пробирку 10 мин при 13000 об/мин.

**9. УДАЛИТЕ НАДОСАДОЧНУЮ ЖИДКОСТЬ.**

10. Добавить 1 мл раствора № 7 и несколько раз перевернуть пробирку.

11. Центрифугировать пробирку 5 мин при 13000 об/мин.

12. Удалить надосадочную жидкость.

13. Подсушить осадок термостатированием пробирки с открытой крышкой в течение 5 мин при 65 °С.

14. Добавить 100 мкл раствора № 8.

15. Термостатировать пробирку 15 мин при 65 °С, периодически ее встряхивая.

Полученный препарат ДНК хранить при минус 20 °С в течение шести месяцев.

**ВНИМАНИЕ!** Для использования в ПЦР препарат ДНК необходимо развести в 10 раз раствором № 8.

**Примечание!** В растворе № 3 допускается выпадение осадка. Перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона в течение 10–15 мин при 65 °С.

## Часть 2. Качественное определение ГМО

### *Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции*

1. Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца «К-», для положительного контрольного образца «К+». При использовании ПЦР-детектора для учета результатов амплификации (формат «Flash») промаркировать дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.

2. Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Таq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.

3. В каждую пробирку добавить по одной капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.

4 Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенную для выделения ДНК из биологического материала.

5. Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»). Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

6. В пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», внести 5,0 мкл *отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК* (п.1), а в



пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7. Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3–5 сек.

8. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном в табл. 1 и 2, с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл.

Таблица 1

Формат «Flash»

Режим амплификации для амплификатора «Терцик»

№ п/п	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	94	1 мин 30 сек	1
2	94	20 сек	5
	64	5 сек	
	67	5 сек	
3	94	1 сек	40
	64	5 сек	
	67	5 сек	
4	10	Хранение	

Таблица 2

Формат «Real-time»

Режим амплификации для детектирующего амплификатора «ДТ-322»

№ п/п	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	80	30 сек	1
	94	1 мин 30 сек	
2	94	30 сек	5
	64*	15 сек	
3	94	10 сек	45
	64*	15 сек	
4	10	Хранение	

\* – регистрация результатов.

*Регистрация результатов амплификации*

9. Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора: после прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соот-

ветствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75–2,10, для внутреннего контрольного образца – 2,50).

10. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора ДТ-322: регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

*Учет результатов реакции с помощью ПЦР-детектора и детектирующего амплификатора.*

11. Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

12. В образцах, содержащих ДНК промотора 35S и/или терминатора NOS, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.

13. В образцах, не содержащих ДНК промотора 35S и ДНК терминатора NOS, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

14. В случае отрицательного результата на наличие ДНК промотора 35S, терминатора NOS и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из исследуемого материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие биологического материала.

15. При учёте результатов с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфики (наличие ДНК промотора 35S и/или терминатора NOS) попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в

учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

16. При получении положительного результата на наличие ДНК промотора 35S и/или терминатора NOS для отрицательного контрольного образца «К-» результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

### Часть 3. Количественное определение ГМО (на примере тест-системы «КВАНТУМ-П СОЯ»)

#### *Создание протокола проведения полимеразной цепной реакции*

1. Создать тест (или выбрать ранее созданный тест) «ГМИ количественный» со следующими параметрами:

- тип проводимого анализа «ГМИ», метод «геометрический (Cp)»;
- типы пробирок: образец, стандарт, контроль+, контроль-;
- количество стандартов – 3, дублей – 2;
- количество копий для стандарта 1 указать «0,1»; для стандарта 2 указать «1»; для стандарта 3 указать «5»;
- положительных (К+) и отрицательных (К-) контролей – по 2;
- объем рабочей смеси в пробирке – 35 мкл;
- флуорофоры: FAM-специфика, HEX-BK;
- программа амплификации – указанная в табл. 3.

Таблица 3

#### Режим амплификации для детектирующего амплификатора «ДТ-322»

№ п/п	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	80	2 мин	1
2	94	1 мин 30 сек	1
3	94	10 сек	50
	62 *	20 сек	
	67	20 сек	
4	10	Хранение	

\* – регистрация результатов.

2. Создать протокол амплификации, для чего:

- в окне «протокол» выбрать опцию «добавить тест», в появившемся окне выбрать тест «ГМИ количественный» (см. п. 1);

- указать количество исследуемых образцов (количество дублей – 2).

*Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции*

3. Промаркировать в соответствии с созданным протоколом амплификации необходимое количество пробирок с запечатанной парафином реакционной смесью.

4. В промаркированные пробирки добавить по 10 мкл тщательно перемешанного на вортексе раствора Таq-полимеразы.

5. В промаркированные пробирки добавить по 20 мкл минерального масла (приблизительно одна капля из наконечника на 200 мкл).

6. Пробирки плотно закрыть и перенести в помещение, предназначенное для пробоподготовки.

7. В пробирки, соответствующие обозначенным в протоколе амплификации «стандарт 1», внести 5 мкл калибровочного стандарта ГМ СОЯ 0,1 %; в пробирки «стандарт 2» – 5мкл калибровочного стандарта ГМ СОЯ 1 %; в пробирки «стандарт 3» – 5 мкл калибровочного стандарта ГМ СОЯ 5 %.

8. Внести в соответствующие пробирки по 5 мкл исследуемого образца ДНК.

9. В пробирки, соответствующие «К-», внести 5 мкл отрицательного контрольного образца; в пробирки, соответствующие К+, внести 5 мкл положительного контрольного образца (К+ КВАНТУМ-П СОЯ).

*Примечание.* Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК в амплификационную смесь наконечниками с аэрозольными барьерами.

10. Осадить капли со стенок пробирок центрифугированием на вортексе в течение 2–3 сек.

11. Пробирки установить в соответствующие лунки амплификатора, выбрав опцию «применить», перейти в окно «запуск программы амплификации»,

запустить программу амплификации, выбрать директорию для сохранения результатов амплификации.

*Анализ результатов полимеразной цепной реакции*

12. Регистрация и учет результатов амплификации проводится автоматически во время амплификации с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором ДТ-322.

13. Анализ результатов производится автоматически после окончания программы амплификации.

14. В столбце % ГМО для каждого образца отражаются результаты анализа в виде процентного содержания ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои. Линейный диапазон измерений составляет от 0,1 до 5 % ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои. Если результат больше, чем 5 %, то он трактуется как содержание ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои более 5 %. Если результат меньше, чем 0,1 %, то он трактуется как содержание ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои менее 0,1 % (рис. 1).

15. Появление любого значения Ср в канале FAM или HEX для отрицательного контрольного образца свидетельствует о наличии контаминации. В этом случае результаты всей постановки бракуют; следует провести мероприятия по устранению контаминации.

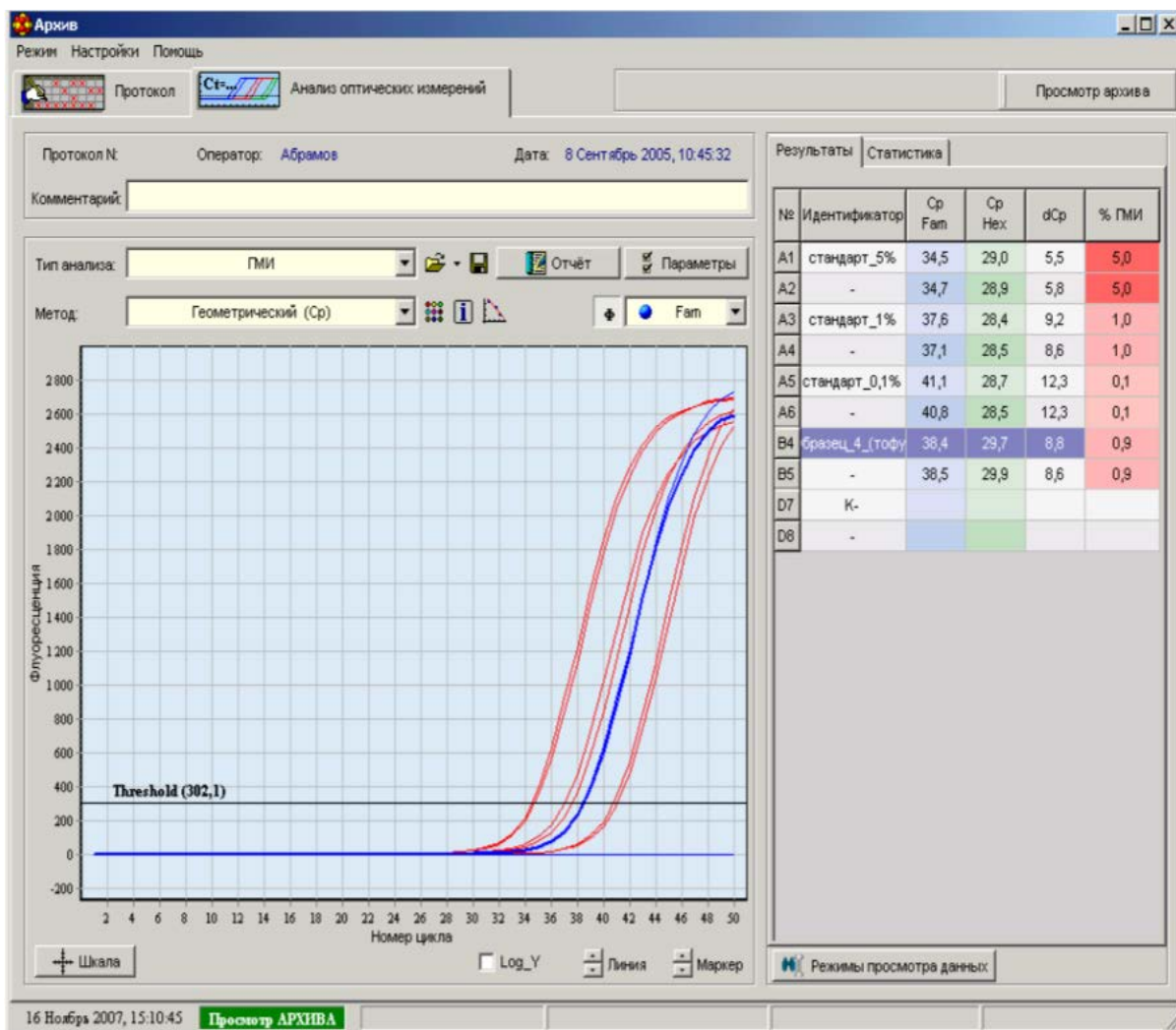


Рисунок 1 – Пример количественного определения ГМО с использованием детектирующего амплификатора ДТ-322 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»)

### Контрольные вопросы

1. Каков принцип метода ПЦР?
2. Из каких этапов состоит цикл ПЦР?
3. Из каких компонентов состоит реакционная смесь?
4. Каковы основные причины получения ложноположительных результатов при проведении ПЦР?
5. Какие контроли и с какой целью используют при постановке ПЦР?
6. В какой очередности осуществляют внесение образцов и контролей в ПЦР-смесь?

7. Каково устройство ПЦР-лаборатории?
8. Каково практическое применение метода ПЦР?
9. В чем преимущества и недостатки метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний?
10. Перечислите необходимые реактивы и их значимость для проведения метода ПЦР в режиме реального времени?
11. Объясните принцип работы амплификатора для проведения ПЦР?
12. Что такое 35S и NOS?
13. Как проводится количественное определение ГМО?
14. Перечислите основные нормативные документы, необходимые при работе в лаборатории ПЦР реального времени?
15. Какие ферменты необходимы для проведения метода ПЦР?

## **Лабораторная работа № 2 – Выделение ДНК из селезёнки крупного рогатого скота и гонад рыб**

**Цель работы:** приобрести умения и навыки по выделению ДНК из образцов животных тканей.

### **Задание по лабораторной работе:**

1. Овладеть методикой выделения ДНК из животной ткани.
2. Определить выход ДНК, исходя из теоретических данных о содержании ДНК в селезенке крупного рогатого скота.
3. Проанализировать современные тенденции в генной инженерии животных.

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ**

Способ заключается в том, что селезенку крупного рогатого скота пропитывают водой в течение 5–60 мин, замораживают, измельчают, гомогенизируют. Затем проводят отмывку ядерного материала стандартным солевым раствором, депротеинизацию с помощью хлористого натрия и додецилсульфата натрия, часть скоагулированного белка отделяют фильтрацией, лизат центрифугируют, еще раз фильтруют и осаждают ДНК изопропанолом. Выход ДНК 750–850 мг на 100 г селезенки, время выделения 4,5 ч.

#### ***Материалы:***

- сухой лед;
- стандартный солевой раствор (SSC 0.15M NaCl + 0.015M цитрат натрия, рН 7,2);
- 17%-ный раствор додецилсульфата натрия (можно заменить обычным моющим средством)
- 5M раствор NaCl;
- этиловый спирт;
- 60-, 70-, 80-, 100%-ный изопропанол.



### ***Оборудование:***

- мясорубка;
- весы лабораторные;
- гомогенизатор РТ-1 (блендер);
- центрифуга;
- стеклянный фильтр, марля.

### ***Ход работы***

#### Часть 1. Приготовление растворов:

1. Стандартный солевой раствор готовят, смешивая 0.15M NaCl + 0.015M цитрат натрия в пропорции 1:1.

2. Для приготовления раствора 0.15M NaCl в стакане взвешивают 8,78 г химически чистого NaCl на аналитических весах. Навеску количественно переносят в мерную колбу на 1000 мл, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают до полного растворения навески.

3. Для приготовления раствора 0.015M цитрата натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , лимоннокислый натрий) в стакане взвешивают 3,87 г химически чистого цитрата натрия на аналитических весах. Навеску количественно переносят в мерную колбу на 1000 мл, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают до полного растворения навески.

4. Для приготовления раствора 5M NaCl в стакане взвешивают 292,5 г химически чистого NaCl на лабораторных весах. Навеску количественно переносят в мерную колбу на 1000 мл, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают до полного растворения навески.

#### Часть 2. Методика:

1. Селезенку коровы пропитывают водой в течение 30 мин и замораживают сухим льдом.

2. Селезенку с помощью ножа и молотка разрубают на куски и прокручивают через мясорубку.

3. Взвешивают 100 г фарша, добавляют 500 мл стандартного солевого раствора (SSC. 0.15M NaCl + 0.015M цитрат натрия, pH 7,2) и гомогенизируют в течение 2 мин с помощью гомогенизатора РТ-1 в блендере (рис. 2).



Рисунок 2 – Измельчение животных тканей в блендере

\* Обратите внимание, сначала ведется работа с осадком, надосадочная жидкость сливается.

4. Гомогенат фильтруют через сетку с ячейками размером 2 мм (через два слоя марли) и центрифугируют в одном стакане центрифуги (2500 об/мин, 10 мин, 0 °С) (рис. 3).



Рисунок 3 – Центрифуга

5. После центрифугирования осадок повторно гомогенизируют 1 мин в 600 мл SSC и повторяют центрифугирование в течение 5 мин.

6. Осадок ресуспендируют 10 сек с помощью гомогенизатора в 600 мл SSC и приливают при перемешивании 120 мл 17%-ного раствора додецилсульфата натрия.

7. Смесь нагревают до 60 °С при перемешивании и через 10 мин добавляют 200 мл 5М NaCl.

8. Перемешивание продолжают 15 мин и затем раствор охлаждают до 10°С. Добавляют при перемешивании 500 мл 5 М NaCl, охлажденного до 0 °С.

9. Смесь фильтруют через четыре слоя марли и затем центрифугируют (2500 об/мин, 30 мин, 0 °С).

\* ВНИМАНИЕ!! Теперь начинается работа с надосадочной жидкостью, осадок отбрасывается.

10. Надосадочную жидкость фильтруют самотеком через стеклянный фильтр (размер пор 300–500 мкм), первоначально смочив фильтр дистиллированной водой (рис. 4).



Рисунок 4 – Стеклянный фильтр (фильтр Шотта)

11. Полученные 1350 мл раствора ДНК осаждают путем добавления одного объема (1350 мл) этанола.

12. Раствор фильтруют через высушенный и взвешенный бумажный фильтр. Осадок промывают последовательно 60-, 70-, 80-, 100%-ным изопропанолом, после чего высушивают фильтр с промытым осадком и определяют выход ДНК к массе первоначально взятой навески сырья и к теоретической массе ДНК, содержащейся в селезенке (2,5 %).

13. Используя различные источники литературы, разработать методику выделения ДНК из гонад (молоч и икры) рыб.

## Контрольные вопросы

1. Заполните таблицу:

Метод выделения	Этапы выделения	Преимущества методы	Недостатки метода

2. Какой детергент используют для экстракции ДНК, каково его назначение?

3. Почему рН экстрагирующего буфера должен быть равен 8?

4. Для чего используют фенол и хлороформ?

5. Каковы основные этапы выделения и очистки нуклеиновых кислот при использовании методов сорбции?

6. Каково действие гуанидинтиоционата?

7. С какой целью применяется солевой буфер?

8. Какова роль суспензии ионообменников?

## Лабораторная работа № 3 – Выделение ДНК из лука репчатого

**Цель работы:** выделить ДНК из образцов растительной ткани; приобрести навыки выделения ДНК из растительных тканей.

### **Задание по лабораторной работе:**

1. Провести простой и быстрый метод осаждения нуклеиновой кислоты.
2. Описать принципиальные отличия выделения ДНК из животных и растительных клеток.
3. Проанализировать современные тенденции в геномной инженерии растений.

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ**

#### ***Материалы и реактивы:***

- половинка головки лука;
- поваренная соль (ложка);
- спирт (> 95%-ный этанол) или изопропанол (несколько миллилитров, лучше, если он заморожен или хотя бы покрыт льдом);
- средство для мытья посуды;
- ступка;
- маленькая воронка;
- фильтр для кофе, или бумажное полотенце, или одноразовая бумажная салфетка;
- зубочистка;
- вода;
- посуда: стакан или банка, маленький стаканчик или маленькая банка, пробирка или высокая узкая рюмка;
- лед;
- нож;
- разделочная доска;

- мисочка или небольшой горшочек;
- ложечка;
- льняная ткань;
- молоток или пестик.

**ВНИМАНИЕ !!!** Эксперимент безопасен, но нельзя вдыхать пары алкоголя, особенно изопропанола. Особые условия – очень важно иметь доступ к холодильнику – эксперимент получается оптимально, если алкоголь сильно охлажден. Необходим также лед.

#### *Техника определения*

1. Растворить одну ложку поваренной соли (не йодированной) в 100 мл воды. Несколько кубиков льда завернуть в льняную ткань, потолочь молотком на мелкие куски и насыпать в мисочку или маленький горшочек.

2. Из средней части половинки головки лука вырезать кусок размером больше 3 см, при этом не прихватите ту часть, откуда растут корни. Изъятый кусочек лука надо нарезать на мелкие части и положить в ступку, добавить две ложки водного раствора соли и энергично тереть до получения однородной массы.

3. Полученную массу перенести в маленький стакан, добавить водный раствор соли в таком количестве, чтобы общий объем увеличился в два-три раза, добавить одну большую каплю средства для мытья посуды и тщательно перемешать. Стакан поставьте в миску со льдом так, чтобы уровень льда доходил до уровня жидкости в стакане. Подождите 5 мин, иногда помешивайте. Если через некоторое время в стакан опустите зубочистку, то заметите, что жидкость стала липкой.

4. Опустите воронку в пробирку (пробирку поместите в стеклянную банку или укрепите на штативе). Внутреннюю поверхность воронки выложите куском салфетки и слегка увлажните водой. Достаньте стакан из льда и вылейте из него жидкость в воронку. Подождите, пока в пробирке соберется фильтрат (достаточно, если столб жидкости достигнет высоты около 4–5 см).

5. После этого осторожно вытащите воронку из пробирки, слегка наклоните ее. Уберите воронку, немножко наклоните и по стенке осторожно начните заливать охлажденный спирт так, чтобы столбик спирта занял ту же высоту, что и столбик фильтрата. Поставьте пробирку и подождите, примерно, 2–3 мин. Спирт останется в верхней части, а на стыке фаз можно увидеть процесс осаждения ДНК. Пробирку можно слегка наклонить и осторожно крутить вокруг вертикальной оси. ДНК образует маленькие нитеобразные белые хлопья. Их можно даже накрутить на зубочистку. Вытащите зубочистку из раствора и после просушки увидите, что ДНК стала невидимой. Она хорошо растворяется в воде.

### **Контрольные вопросы**

1. Почему выделить ДНК легче из животных клеток, чем из растительных?
2. Какой процесс имеет важное значение при классическом способе выделения ДНК из тканей растений?
3. Чем отличаются процессы экстракции ДНК из растительных и животных тканей?
4. Какие ферменты имеют наибольшее значение при выделении ДНК из растительных клеток?
5. Сделать актуальный обзор БАД с содержанием нуклеиновых кислот.

## Литература

1. ПЦР в реальном времени: практическое пособие / под общ. ред. Д. В. Ребрикова. – 8-е изд., электрон. – Москва: Лаборатория знаний, 2020. – 226 с.
2. Алексеев, Я. И. 35S промотор вируса мозаики норичника (P-FMV) – новая мишень для анализа на содержание генетически модифицированных организмов / Я. И. Алексеев [и др.] // Известия ТСХА. – 2011. – Вып. 6. – С. 156–161.
3. ГОСТ Р 53244-2008. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. – Москва: Стандартинформ, 2009. – 61 с.
4. Сравнительный анализ методов выделения ДНК из тканей животных для оценки генотоксического действия ионизирующего излучения. doi: 10.13140 / 2.1.1370.2725 [Электронный ресурс] – Режим доступа: [https://www.researchgate.net/publication/269390859\\_sravnitelnyj\\_analiz\\_metodov\\_vydelenia\\_dnk\\_iz\\_tkanej\\_zivotnyh\\_dla\\_ocenki\\_genotoksiceskogo\\_dejstvia\\_ioniziruus ego\\_izlucenia](https://www.researchgate.net/publication/269390859_sravnitelnyj_analiz_metodov_vydelenia_dnk_iz_tkanej_zivotnyh_dla_ocenki_genotoksiceskogo_dejstvia_ioniziruus ego_izlucenia)
5. Рогатых, С. В. Химический состав сред для выделения ДНК из клеток хемолитотрофных микроорганизмов / С. В. Рогатых // Успехи современного естествознания. – 2017. – № 8.
6. Чухловин, А. Б. Метод ПЦР в клинической лабораторной диагностике / А. Б. Чухловин // Справочник заведующего КДЛ. – 2008.
7. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под ред. Вл. В. Кузнецова, В. В. Кузнецова, Г. А. Романова. Текст: электронный. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012 [Электронный ресурс]. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/543304>
8. Учебно-методическое пособие к проведению лабораторных работ и контроля самостоятельной работы студентов по молекулярной биологии Академии биологии и биотехнологии ЮФУ / О. Ш. Карапетьян, Е. М. Вечканов, И. А. Сорокина. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2015.



## ПРИЛОЖЕНИЕ

### Теоретическая часть

#### Выделение ДНК

В настоящем пособии применяется метод осаждения нуклеиновых кислот, который основан на химических свойствах этих соединений. На самом деле происходит выпадение в осадок как РНК, так и ДНК. Но для простоты процедуру называют осаждением ДНК. Выделять нуклеиновые кислоты можно довольно легко, и процесс схож с процессом, протекающим в лабораторных условиях. Поясним суть каждого этапа процедуры.

Механическое давление на ткань: ткань необходимо раздавить до уровня клеток, а сами клетки, чтобы из них выделить ДНК, должны распасться. Для этого наиболее адекватным является интенсивное механическое воздействие на ткань. Это особенно важно в случае растительных клеток, которые окружены толстой клеточной стенкой, и лишь механическое воздействие может разрушить их структуру. Добавление детергента способствует разложению клеточных стенок, состоящих из липидов, а содержимое клетки переходит в раствор. За разрушением клетки может последовать и деградация ДНК (распад на составные элементы и фрагментация). Для превенции этого процесса необходима низкая температура, которая подавляет активность белков (энзимов), деградирующих ДНК, а присутствие солей в растворе вызывает осаждение нуклеиновых кислот. На салфетке остаются все ненужные элементы тканей – основное количество ДНК находится в фильтрате. ДНК – это кислота, осадок которой имеет отрицательный электрический заряд. Благодаря этому ионы  $\text{Na}^+$ , выделенные из поваренной соли, собираются вокруг молекулы ДНК. В насыщенном солевом растворе, если в нем имеется еще и этанол (алкоголь), ДНК меняет свою пространственную структуру, создает агрегаты (большие неупорядоченные комплексы) и выпадает в виде осадка. Эти агрегаты мы и видим в виде длинных нитей. Если алкоголь хорошо охлажден, процесс протекает достаточно эффективно.

**ЗАМЕЧАНИЕ** – длинные нити это не отдельные молекулы ДНК! Они слишком маленького размера, чтобы их увидеть без достаточно мощного микроскопа.

ДНК – это соединение, в структуре которого записана генетическая информация. Для прочтения этой информации необходимы молекулы РНК. В ДНК хранится информация о структуре всех клеточных белков (такие части ДНК мы называем генами). Однако гены составляют лишь небольшую часть ДНК (например, в клетках млекопитающих – лишь 3 %), функцией остальной части является прочтение этой информации, обеспечение структуры ДНК, мультипликация генетической информации, и ее передача материнским клеткам и т. д. Нуклеиновые кислоты вовлечены в регуляцию всех жизненных процессов клеток, а соответственно, всех тканей и организмов.

Необходимо учесть, что процедура достаточно проста, но для гарантированного получения результата ее надо повторить несколько раз.

Примечание: получаемый эффект достаточно хрупкий. То, что мы хотим увидеть, является весьма тонкой структурой, поэтому пробирку надо осматривать под соответствующим освещением.

**Возможные ошибки:**

- не надо брать много материала, так как это приведет к замедлению процесса его охлаждения. В случае головки лука, достаточно взять, примерно 1 см<sup>3</sup> ткани;

- фильтр из бумажной салфетки может забиться. В таком случае ее следует осторожно, не повредив, вытащить из воронки и положить вместо нее новую салфетку;

- этап обработки тканей в ступке имеет ключевое значение, так как именно при этом процессе происходит разрушение структуры клеточной стенки. Чем интенсивнее и тщательнее проведен этот этап, тем больше ДНК выделится из ткани;

- необходимо обеспечить реальное охлаждение материала, т. е. уровень льда должен соответствовать уровню жидкости в стаканчике; хороший резуль-

тат дает вода с плавающими в ней кусочками льда, которую периодически надо помешивать;

- алкоголь должен быть максимально холодным, теплый алкоголь не приводит к эффективному выпадению ДНК в осадок, поэтому необходимо его предварительное охлаждение во льду;

- процесс осаждения ДНК надо проводить аккуратно, чтоб случайно не вызвать ее деградацию; всю процедуру надо проводить быстро. Затягивание процесса приведет к деградации ДНК, заметить которую будет очень сложно.

Альтернативные варианты. Для выделения ДНК можно использовать и другие растения, например, зерна пшеницы, клубнику, киви. Они хороши тем, что в их соке в больших количествах имеются перерабатывающие белок ферменты. В том числе и такие, которые в процессе осаждения ДНК могут вызвать и ее деградацию.

Процедура достаточно проста, но для гарантированного получения результата ее надо повторить несколько раз.

Примечание: получаемый эффект достаточно хрупкий. То, что мы хотим увидеть, является весьма тонкой структурой, поэтому пробирку надо осматривать под соответствующим освещением.

### **Качественное определение ГМО**

На этапе качественного определения ГМО в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяется комплект реагентов «ПРОБА-ЦТАБ» и тест-системы «ФЛАНКГЕН», «СКАН-СОЯ» и «СКАН-КУКУРУЗА» производства ЗАО «НПФ ДНКТехнология». Комплект реагентов «ПРОБА-ЦТАБ» предназначен для выделения ДНК из проб пищевых продуктов и продовольственного сырья; тест-система «ФЛАНК-ГЕН» – для выявления ДНК промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (далее по тексту – промотор 35S) и терминатора NOS *Agrobacterium tumefaciens* (далее по тексту – терминатор NOS); тест-система «СКАН-СОЯ» – для выявления последовательности ДНК, характерной для сои (*Glycine max*);

тест-система «СКАН-КУКУРУЗА» – для выявления последовательности ДНК, характерной для кукурузы (*Zea mays*). Тест-системы производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология» основаны на использовании процесса амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой. В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором. В тест-системах «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ» и «СКАН-КУКУРУЗА» в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции. ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца. Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего старта», который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки. Тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ» и «СКАН-КУКУРУЗА» производятся в двух вариантах: предусматривающем детекцию результатов амплификации после завершения реакции с помощью ПЦР-детектора (формат «FLASH») или в режиме «реального времени» с помощью детектирующего амплификатора (формат «Real-time»).

## **Количественное определение ГМО**

На этапе количественного определения ГМО в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» применяются тест-системы «КВАНТУМ-П СОЯ» и «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА».

Тест-система «КВАНТУМ-П СОЯ» предназначена для определения процентного содержания промотора 35S относительно геномной ДНК сои (*Glycine max*) в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья, содержащих сою. Тест-система «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» предназначена для определения процентного содержания промотора 35S относительно геномной ДНК кукурузы (*Zea mays*) в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья, содержащих кукурузу. Расчет содержания ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои (кукурузы) производится автоматически по окончании реакции ПЦР с использованием калибровочной прямой, строящейся на основании тестирования калибровочных стандартов при каждой новой постановке. При изготовлении калибровочных стандартов, входящих в состав тест-систем «КВАНТУМ-П СОЯ» и «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» применяются сертифицированные референсные материалы производства ERM (European Reference Materials).

## **Этапы определения ГМО**

Качественное и количественное определение ГМО в пищевых продуктах растительного происхождения с помощью тест-систем и оборудования производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология» состоит из следующих этапов:

- выделение ДНК из исследуемого образца с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-ЦТАБ»;
- тестирование выделенной ДНК с помощью тест-системы «ФЛАНКГЕН» в соответствии с инструкцией по применению;
- образцы ДНК, положительные по результатам тестирования с помощью тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», дополнительно исследуются с помощью тест-

систем «СКАН-СОЯ» и «СКАН-КУКУРУЗА» в соответствии с инструкциями по применению;

- для количественного определения промотора 35S в образцах ДНК, положительных по результатам исследования с помощью тест-систем «ФЛАНК-ГЕН» и «СКАН-СОЯ» применяют тест-систему «КВАНТУМ-П СОЯ» в соответствии с инструкцией по применению;

- для количественного определения промотора 35S в образцах ДНК, положительных по результатам исследования с помощью тест-систем «ФЛАНК-ГЕН» и «СКАН-КУКУРУЗА», применяют тест-систему «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» в соответствии с инструкцией по применению.

Схема проведения анализа представлена на рис. 5.

*Примечания:*

– образцы ДНК, положительные по результатам тестирования с помощью тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», и отрицательные по результатам тестирования с помощью тест-систем «СКАН-СОЯ» и «СКАНКУКУРУЗА» требуют дополнительного изучения (тест-системы «КВАНТУМ-П СОЯ» и «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» не применяют) - образцы ДНК, положительные по результатам исследования с помощью тест-систем «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ» и «СКАН-КУКУРУЗА» одновременно, требуют дополнительного изучения (тест-системы «КВАНТУМ-П СОЯ» и «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» не применяют);

– образцы ДНК, положительные по результатам тестирования с помощью тест-систем «ФЛАНК-ГЕН» и «СКАН-КУКУРУЗА», для которых получено значение «0 % ГМИ» при исследовании с помощью тест-системы «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА», требуют дополнительного изучения (в том числе исследования на наличие ДНК кукурузы линии GA-21);

– определение количественного содержания ГМО конкретных линий/сортов проводится с применением методик, предоставляемых разработчиками данных ГМО.

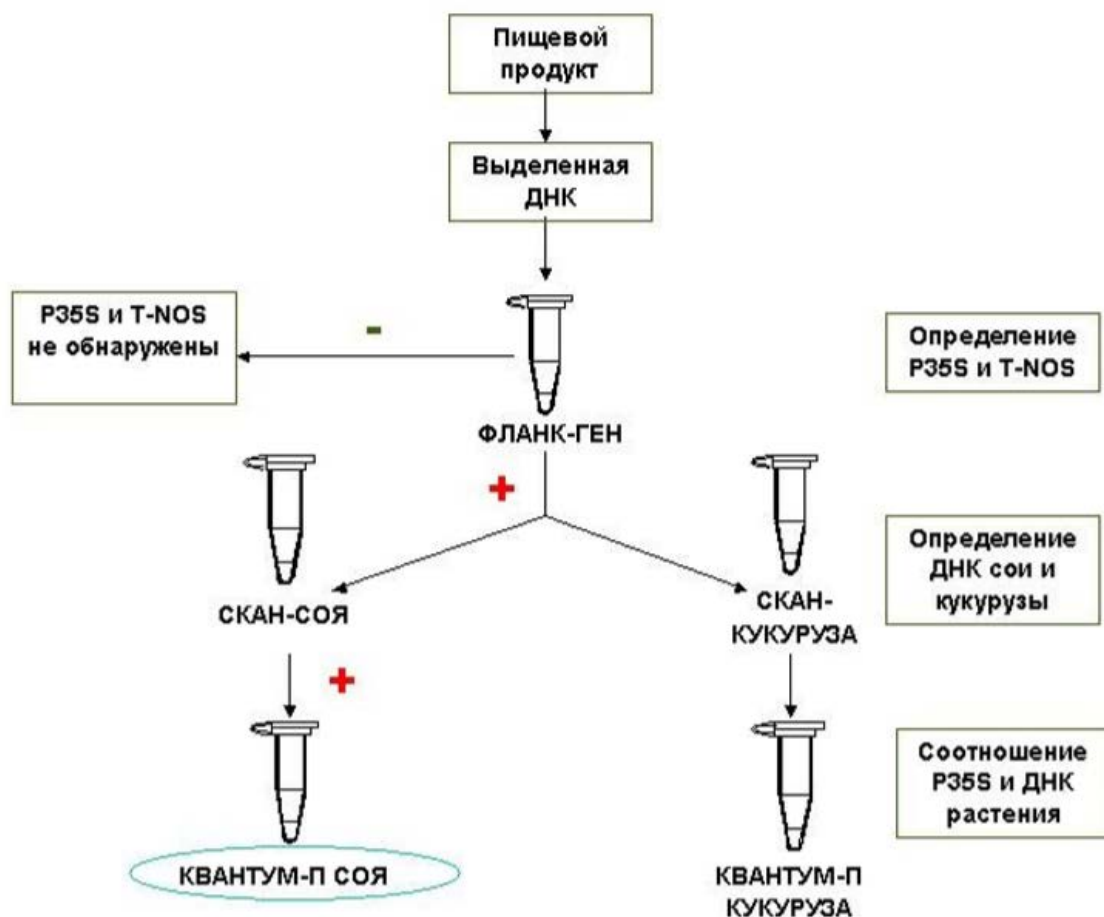


Рисунок 5 – Схема качественного и количественного определения ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием тест-систем производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология»

### Требования к помещениям и техника безопасности

Общее расположение лаборатории, а также ее инфраструктура должны соответствовать требованиям Методических указаний МУ 1.3.1888-04. «Организация работы лабораторий, проводящих исследования с патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности методом полимеразной цепной реакции».

### Правила работы с тест-системами и оборудованием

Все компоненты наборов реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Работать с наборами следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.

При работе с наборами следует использовать только новые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.

Для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ.

Отбор проб проводят в соответствии с методическими документами, устанавливающими порядок отбора проб для однородных групп пищевой продукции: ГОСТ 5904-82, 9163-90, 12292-2000, 10852-86, 13979.0-86, 26313-84, 26312.1-84, 9792-73, 7631-85.

#### Отбор образцов продуктов

*От партии сырья или сыпучих продуктов* отбирают общую пробу следующим образом:



– от исследуемой партии сырья или сыпучих продуктов отбирают не менее 10 образцов проб (по 5–10 г) в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет с использованием одноразовых хирургических перчаток и перемешивают, формируя общую пробу (50–100 г);

– из общей пробы отбирают среднюю пробу массой 10–20 г, помещают в полиэтиленовый пакет, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, печатают и отправляют на анализ.

*От партии продуктов плотной консистенции* отбирают общую пробу массой 10–50 г в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в 96%-ном этаноле и обожженные в пламени газовой горелки) инструменты, который, в свою очередь, дополнительно помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, печатают и отправляют на анализ.

*Пробы жидких продуктов* отбирают в чистые емкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 мл, который, в свою очередь, дополнительно помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, печатают и отправляют на анализ.

#### Подготовка образцов продуктов к анализу

Для подготовки проб необходимо использовать одноразовые полипропиленовые пробирки, ступки и пестики, предварительно обработанные хромовой смесью и фламбированные инструменты – пинцеты, скальпели, ножницы.

*Пробы сухих гранулированных и сыпучих продуктов* отбирают в ступку по 5–10 г и растирают пестиком до гомогенного состояния. Для анализа необходимо 50–150 мкг образца.

*Пробы плотных продуктов* (сырых или подвергшихся кулинарной обработке) весом 5–10 г помещают в ступку, измельчают ножницами, затем растирают пестиком до гомогенного состояния. Для анализа необходимо 50–150 мкг образца.

*Пробы продуктов консистенции крахмала* массой 100–300 мг помещают в одноразовые пластиковые пробирки и добавляют 1,0 мл физиологического раствора. Для анализа необходимо 50–150 мкл образца.

*Пробы жидкой консистенции* отбирают автоматическими пипетками с одноразовыми наконечниками в одноразовые пробирки из полипропилена. Для анализа необходимо 50–150 мкл образца.

#### Хранение и транспортирование проб

Образцы сырья и продуктов рекомендуется хранить в течение одного месяца (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта питания.

Образцы скоропортящихся продуктов рекомендуется хранить в замороженном состоянии (при температуре минус 20 °С) в течение одного месяца (при необходимости повторного анализа).

Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения сырья или пищевого продукта. Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

Учебное издание

Екатерина Владимировна Лютова

## ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Редактор Е. Билко

Подписано в печать 11.03.2021 г. Формат 60x84 (1/16). Уч.-изд. л. 2,2. Печ. л. 1,9.

Тираж 20 экз. Заказ № 18.

Издательство федерального государственного бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Калининградский государственный технический университет»,  
236022, Калининград, Советский проспект, 1