

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.6. - С.186-187

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ LAMP-PCR ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГМО

Аменов А.

Споры о влиянии и последствиях ГМО на организм человека ведутся не первое десятилетие [1]. Для оценки безопасности пищевого использования ГМО сортов, необходимо знать: какова способность этих сортов к накоплению ядовитых для человека и животных инсектицидов, так как практически все пестициды токсичны для человека, и не происходит ли накопления других ядовитых метаболитов или аллергенов под действием плейотропных эффектов трансгенных конструкций [2]. Поэтому остро стоит вопрос о детекции ГМО. Диагностика ГМО должна учитывать особенности конструирования конкретного организма и его биологическую вариабельность. Необходимы методы, позволяющие различить ГМО, при создании которых были использованы одни и те же генно-инженерные конструкции, а также ГМО, несущие одну, две или более конструкций, или их копий. Анализ литературы позволяет судить о многочисленных методах детекции ГМО, на сегодняшний момент имеются ПЦР тест системы, основанные на детекции векторных систем в продуктах питания [3]. Имеются как классические методы ПЦР так и мультиплексные, но в современном мире появляются новые подходы для детекции ГМП, такие как *LAMP*ПЦР[4], позволяющие довольно быстро и качественно определить наличие чужеродной ДНК. Одним условием необходимым для проведения *LAMP* реакции является наличие в ПЦР-смеси 6 и более праймеров, подбор которых является довольно проблематичным на столь короткий участок сиквенса вектора. В нашем методе *LAMP*реакции используется лишь 2 праймера, имеющие комплементарные участки на концах. Оптимизация условий протекания данной реакции и является нашей целью исследования.

Материалы и методы: реакцию проводили при следующих условиях в 25 μ l реакционной смеси, содержащей, 25 нг ДНК, 1x *Isotermal (ThermoPol®)* буфер, 8-10 мМ *MgSO₂*, 1.4 мМ *dNTP*, 0,5-1.6 μ М каждого праймера, и 8 U *Bst 3.0 DNA Polymerase* (8 U/ μ l). Инкубировали пробирки при 55°C -65°C, в течении 30-60 минут. Праймеры были подобраны на правый фланкирующий участок Т-ДНК, промоторные и терминальные регионы вируса мозаики цветной капусты.

Результаты: Первым этапом проводили подбор концентраций праймеров, ионов Mg, концентрации бетаина, а также температурный режим.

Результаты показывают, что оптимальной концентрацией праймеров для проведения *LAMP* реакции является 1 пмоль/мкл для внешних праймеров и 0,2 пмоль/мкл для внутренних праймеров.

Концентрации бетаина для лучшего связывания праймеров является 0,8М. Последним этапом оптимизации было определение длительности реакции, опытным путем выявили, что наибольшее количество ПЦР продукта образуется при 45 минутной амплификации.

При подборе условий проведения реакции учитывали температуру протекания реакции. Было выявлено что положительные реакции демонстрируют в диапазоне от 63°C до 65°C.

Таким образом, были подобраны подходящие условия для проведения *LAMP* реакции: 45минутная амплификация при температуре 65°C с концентрациями праймеров 1пмоль/мкл, концентрация бетаина 0,8М.

Список литературы

1. Chaouachi M., Berrard A., Sacad K. Relative quantification in seed GMO analysis: State of art and bottlenecks // Transgenic Research. 2013.
2. Block A. et al. The GMOseek matrix: a decision support tool for optimizing the detection of genetically modified plants // BMC Bioinformatics. 2013. Vol. 14. P. 1.
3. Michelini E. et al. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: An update // Anal. Bioanal. Chem. 2008.
4. Querci M. et al. New approaches in GMO detection // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010.