

24. Kim, W. Y., Kaelin, W. G. (2004). The role of VHL mutation in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22 (24), 4991–5004. doi: 10.1200/jco.2004.05.061

25. Kudo, Y., Takata, T., Ogawa, I., Kaneda, T., Sato, S., Takekoshi, T., Zhao, M., Miyauchi, M., Nikai, H. (2000). p27Kip1 Accumulation by inhibition of proteasome function

induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 6 (3), 916–923.

26. Tu, Y., Xu, J., Zhou, Z. G., Wang, C. Y. (2012). The ubiquitin proteasome pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 5 (8), 726–738.

Дата надходження рукопису 15.10.2015

Сокур Олеся Вадимовна, доктор біологічних наук, старший научний співробітник, завідувачка лабораторії, Научно-экспериментальная лаборатория «Физико-химической биологии» научно-учебного центра «Институт биологии», Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, г. Киев, Украина, 01601
E-mail: dolesya60@mail.ru

Тимошенко Мария Александровна, кандидат біологічних наук, молодший научний співробітник, Научно-экспериментальная лаборатория «Физико-химической биологии» научно-учебного центра «Институт биологии», Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, г. Киев, Украина, 01601
E-mail: maria.bulavka@gmail.com

Коваль Татьяна Владимировна, вчений інженер, Научно-экспериментальная лаборатория «Физико-химической биологии» научно-учебного центра «Институт биологии», Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, г. Киев, Украина, 01601
E-mail: stanya@bigmir.net

Богун Лариса Ивановна, кандидат біологічних наук, старший научний співробітник, Научно-экспериментальная лаборатория «Физико-химической биологии» научно-учебного центра «Институт биологии», Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, г. Киев, Украина, 01601
E-mail: bogynal@gmail.com

УДК 602.6:577.1

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.53844

КОНСТРУЮВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ДІАГНОСТИКУМУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ГЛІФОСАТ-РЕЗИСТЕНТНОЇ ГЕНЕТИЧНО-МОДИФІКОВАНОЇ СОЇ

© В. Г. Спиридонов, Я. В. Хоменко, В. Д. Іщенко, В. С. Гончаренко, Н. М. Шимко, Д. Ю. Рибальченко

В процесі роботи рекомбінантним ферментом 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат синтазою (CP4 EPSPS), що надає ознаки толерантності до гліфосату ГМ-сої, імунізовано домашню курку та отримання жовткові специфічні антитіла IgY. Представлені етапи конструювання імуноферментного діагностичного тесту, що дозволяє виявляти не менше 0,1 % генетично-модифікованої сої, стійкої до гліфосату

Ключові слова: генетично модифіковані рослини, ІФА, 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат синтаза, жовткові антитіла

During research we have utilized recombinant enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (CP4 EPSPS), conferring resistance to glyphosate for GM soybean, for the hen immunization and obtaining specific yolk antibodies IgY. Stages of ELISA development that can detect at least 0,1 % of GM-soybean resistant to glyphosate were present

Keywords: genetically modified plants, enzyme immunoassay, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, yolk antibodies

1. Вступ

Стійкі до гербіцидів трансгенні культури складають близько 60 % всіх генетично-модифікованих с.-г. культур, серед яких перше місце посідає гліфосат-резистентна соя, обсяги річного виробництва

якої сягають більше 260 мільйонів тон. Сьогодні країнами лідерами у виробництві сої є Сполучені Штати, Бразилія та Аргентина в яких депоновано більше 80 % світового виробництва сої [1]. Зростання виробництва соєвих бобів в основному обумов-

лено високою рентабельністю культури, державною підтримкою та високим попитом для тваринницької галузі в якості кормів з високим вмістом протеїнів. З урахуванням постійного зростання попиту на продукцію тваринництва у світі соя розглядається як стратегічна культура для продовольчої безпеки у майбутньому [2].

2. Аналіз літературних даних і постановка проблеми

На початку 90-х минулого століття вчені компанії Монсанто запатентували толерантний до інгібітору гліфосату ензим EPSPS, ген якого було виділено з агробактерії (*Agrobacterium tumefaciens* sp., штам CP4), що мешкала у стічних водах заводу з виробництва гліфосату. Біотехнологічним шляхом ген CP4 EPSPS було привнесено у геном сої, утворюючи при цьому стійку до гліфосату лінію 40-3-2. Це було початком нової ери комерціалізації трансгенних ліній стійких до гербіцидів сільськогосподарських рослин, таких як, соя, кукурудза, ріпак, бавовна, цукровий буряк, тощо [3].

В Україні інтерес до виробництва сої зростає з кожним роком, так за даними Держкомстат України у 2013 році валовий збір сої становив 2,7 млн. т., а до 2016 року планується зібрати до 4,5 млн. т. При цьому, за неофіційними даними, в Україні близько 60 % нелегально вирощується гліфосат резистентна генетично-модифікована соя, лінії 40-3-2 [4].

Враховуючи той факт, що за останніми даними показано онкогенну властивість гліфосату на здоров'я людини, що збільшує ризики виникнення Неходжкінської лімфоми, в європейських країнах вже діє заборона на використання гліфосату, а його слідові кількості жорстко регламентуються у кінцевій с.-г. продукції. Таким чином, необхідність проведення постійного моніторингу за розповсюдженням гліфосат-резистентних ГМ-рослин є безперечним [5].

Відповідно до постанови КМУ «Про затвердження Порядку етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми або вироблені з їх використанням та вводяться в обіг» від 13.05.2009 № 468, якщо харчові продукти містять ГМО більше 0,9 %, виробник зобов'язаний зазначати відповідну інформацію на етикетці [6]. У зв'язку з цим МОЗ України затвердило «Перелік харчових продуктів, щодо яких здійснюється контроль вмісту генетично модифікованих організмів [7]. Для забезпечення виконання вказаних нормативних документів передбачено створення мережі акредитованих лабораторій з питань випробування ГМО методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Проте на даний час така мережа лабораторій є недостатньо розвинута у зв'язку з високою вартістю матеріально-технічної бази для проведення таких досліджень.

Альтернативним підходом до виявлення ГМО, є методи які ґрунтуються на детекції чужорідних протеїнів наприклад імуноферментний аналіз (ІФА). Основні принципи якого викладені у міжнародному стандарті ISO 21572:2004 [8]. Реалізація ІФА перед-

бачає меншу кількість етапів, що зменшує вплив різноманітних факторів, в том числі і людського, на результат дослідження. Метод рекомендується як першочерговий інструмент для скринінгу рослинної сировини.

3. Мета та задачі дослідження

Метою цієї роботи була розробка імуноферментного (ІФА) діагностичного для виявлення генетично-модифікованої сої (RoundUp Ready 40-3-2). Для реалізації поставленої мети було вирішено такі завдання:

1. Провести імунізацію курки (*Gallus gallus*) рекомбінантним ензимом CP4 EPSPS та отримати жовткові специфічні антитіла IgY.

2. Синтезувати імуноферментний кон'югат специфічних афінних IgY з пероксидазою хрому.

3. Сконструювати конкурентний імуноферментний аналіз для виявлення ГМ-сої, стійкої до гербіциду гліфосату.

4. Матеріали і методи

Реагенти та обладнання

Реактиви:

Рекомбінантний ензим CP4 EPSPS, отримано раніше в лабораторних умовах (неопубліковані дані). Хімічні реактиви, кваліфікації «Molecular biology grade» від компаній Sigma (США), Carl Roth (Німеччина), Amresco (США); поживні середовища Difco (BD Group); полістирольні 96-ти лункові планшети Sarstedt, (Німеччина); анти видовий кон'югат з пероксидазою хрому AbD Serotec (Великобританія), та інші.

Зразки:

Позитивні зразки: листя ГМ-сої (RoundUp Ready 40-3-2), попередньо перевірені у ПЛР; сертифіковані референс зразки сої RoundUp Ready 40-3-2, кат. № ERM-BF410 bk, ERM-BF410 dk, ERM-BF410 gk вміст ГМО 0,1, 1,0 та 10,0 %, відповідно (IRMM, Бельгія);

Негативні зразки: насіння сої, сорт Черемош;

Для дослідження перехресної реактивності, досліджували насіння ГМ-сої A2704-12 (Liberty Link), толерантної до іншого гербіциду Liberty, діючої речовиною якого є фосфінотрицин.

Методи:

1. Імунізація курки рекомбінантним антигеном CP4 EPSPS

Для імунізації використовували 5-ти місячну курку породи білий леггорн масою 1,5 кг, яку утримували в стандартних умовах у віварію факультету ветеринарної медицини НУБіП України. Імунізацію проводили тричі: перша із використанням повного ад'юванта Фрейнда (Thermo Scientific, США), дві послідовні з інтервалом 10 діб із використанням неповного ад'юванта Фрейнда (Thermo Scientific, США). Для кожної імунізації використовували рекомбінантним антиген CP4 EPSPS у кількості 200 мкг, препарат антигену вводили внутрішньом'язово, в курячу грудку (грудний м'яз). З метою визначення титру імуноглобулінів специфічних до CP4 EPSPS у курки відбирали сироватку крові із плечової (підкри-

лової) вени до та після кожної імунізації і перевіряли в непрямому ІФА.

2. Виділення жовткових антитіл

Жовткові антитіла (Ig Y) виділяли методом ПЕГ-преципітації [9] Очищену фракцію сумарних Ig Y розчиняли у фосфатно-сольовому буфері, визначали концентрацію та перевіряли у непрямому ІФА.

3. Непрямий ІФА титрів специфічних антитіл проти CP4 EPSPS

Рекомбінантний антиген CP4 EPSPS в концентрації 10 мкг/мл сорбували у 96-лункові полістиролові планшети фірми „Sarstedt“ (Німеччина) в 0,05 М карбонатно-бікарбонатному буфері, рН 9,6 та витримували у холодильнику при температурі 4 °С протягом 16–18 год. Після закінчення інкубації вміст лунок витрушували та промивали планшети розчином для відмивання (25 мМ Na₂HPO₄, 4 мМ NaH₂PO₄, 3 мМ NaCl та 0,05 % Tween-20).

Зразки сироватки крові розводили 1:20 розчином для розведення зразків (25 мМ Na₂HPO₄, 4 мМ NaH₂PO₄, 3 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 2 М сечовина, 12,5 % сухе знежирене молоко та 0,05 % Tween-20). При дослідженні жовткових антитіл, робили ряд двохкратних розведень (50, 25, 12,5, 6,25, та 3,12 мкг/мл). Зразки сироватки крові або жовткові антитіла вносили у лунки планшета та витримували в термостаті протягом 60 хв при 37 °С. Після завершення інкубації для видалення антитіл, що не зв'язалися, лунки чотирикратно промивали розчином для відмивання при використанні автоматичного промивача планшет.

Специфічні антитіла, що зв'язалися з рекомбінантним антигеном CP4 EPSPS виявляли антивидовим кон'югатом фірми AbD Serotec (Великобританія), що представляв собою вторинні козячі антитіла проти антитіл курки, мічені пероксидазою хрому. Кон'югат вносили в лунки планшета у робочому розведенні 1:4000 та інкубували 30 хв у термостаті при 37 °С. Після чого лунки планшета знову промивали розчином для відмивання при використанні автоматичного промивача планшет.

Специфічні імунні комплекси проявляли із використанням розчину хромогену тетраметилбензидину (ТМБ) (Clinical Science Products Inc., США). Розчин хромогену вносили по 100 мкл у кожну лунку та інкубували упродовж 30 хв при кімнатній температурі у темному місці.

Кольорову ферментативну реакцію зупиняли, вносячи в лунки планшета по 50 мкл стоп-регенту (2 М сірчана кислота). Облік реакції проводили за допомогою автоматичного спектрофотометру у двохвильовому режимі при 450 та 620 нм.

4. Синтез афінного сорбенту та виділення специфічних жовткових антитіл проти CP4 EPSPS

Суспензію сефарози-6В (Sigma, США), об'ємом 1,0 мл відмивали 0,5 М карбонатним буфером (рН=11,2), після чого додавали 0,25 мл дивініл сульфону. Реакційну суміш перемішували на орбітальному шейкері протягом 60 хвилин. Активовану сефарозу відмивали водою до нейтрального значення рН та ресуспендували у 5,0 мл 0,1 М карбонатного буферу рН 9,0, що містив 20 мг рекомбінантного білку CP4

EPSPS. Реакційну суміш інкубували протягом 15–20 годин на орбітальному шейкері. Після закінчення терміну реакції конденсації до реакційної суміші додавали 20 мкл етаноламіну для блокування надлишкових активованих груп сефарози та перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Отриманий афінний носій відмитий водою до нейтрального значення рН використовували для виділення специфічних поліклональних жовткових антитіл. Виділення проводили використовуючи хроматографічну систему низького тиску BioLogic LP (Bio-Rad, США). Для цього колонку з афінним носієм, об'ємом 1,0 мл врівноважували 50 мМ розчином Трис-НCl, (рН 7,3 при 22 °С) та наносили 5,0 мл виділених жовткових антитіл з концентрацією 5,5 мг/мл. Колонку промивали 45 мл 50 мМ розчину Трис-НCl. Елюцію афінних антитіл проводили 0,1 М розчином гліцину (рН 2,5) при цьому проводили нейтралізацію фракцій елюції додаючи 1 М Трис- НCl, (рН 8,8 при 22 °С) та 3 М KCl у співвідношенні 1:20 та 1:10, відповідно.

5. Кон'югація афінних жовткових антитіл проти CP4 EPSPS з пероксидазою хрому та конструювання конкурентного ІФА.

Для синтезу імуоферментного кон'югату афінних курячих жовткових антитіл проти трансгенного ензиму CP4 EPSPS з пероксидазою хрому застосовували класичний перйодатний метод [8]. Специфічність отриманого кон'югату (IgY–HRP) перевіряли шляхом титрування у конкурентному імуоферментному аналізі із використанням водного екстракту з насіння 100 % позитивної ГМ-сої (RoundUp Ready 40-3-2) та негативної сої, статус яких був попередньо підтверджений у ПЛР-РЧ.

6. Проведення конкурентного ІФА із використанням референс зразків

Зразки для дослідження зважували по 100 мг та додавали 1000 мкл дистильованої води. Для дослідження чутливості методу, досліджували сертифікований референс-матеріал з різним вмістом ГМО, а саме: 0,1, 1,0, 10 та 100 %. При цьому всі зразки аналізували у трьох повторях, для визначення відтворюваності розробленої методики. Зразки ретельно перемішували та інкубували при кімнатній температурі 5–10 хв. По закінченню інкубації водні екстракти центрифугували при 3000 об/хв протягом 1 хвилини. Надосад використовували для дослідження у конкурентному ІФА.

Рекомбінантний антиген CP4 EPSPS в концентрації 10 мкг/мл сорбували у 96-лункові полістиролові планшети як і при непрямому варіанті ІФА.

У лунки сенсibilізованого планшета вносили по 50 мкл водних екстрактів досліджуваних зразків насіння, після чого додавали по 50 мкл синтезованого кон'югату (IgY–HRP) із визначеним заздалегідь титром (1:1600). Планшет інкубували в термостаті 60 хв при 37 °С. Після завершення інкубації лунки планшета чотирикратно промивали розчином для відмивання при використанні автоматичного промивача планшет. Для визначення фонового сигналу ІФА використовували контроль кон'югату (КК) – в лунки планшета вносили тільки розчин кон'югату, без додавання досліджуваних зразків.

Розчин хромогену вносили по 100 мкл у кожну лунку та інкубували упродовж 30 хв при кімнатній температурі у темному місці.

Кольорову ферментативну реакцію зупиняли, вносячи в лунки планшета по 50 мкл стоп-реагенту (2 М сірчана кислота). Облік реакції проводили за допомогою автоматичного спектрофотометра у двох-вильовому режимі при 450 та 620 нм.

Інтерпретацію результатів конкурентного ІФА проводили із використанням показника – відсоток інгібіції (ВІ), який розраховували за формулою:

$$VI = \frac{OG_{KK} - OG_{зразка}}{OG_{KK}} \times 100,$$

де ОГ КК – оптична густина контролю кон'югату.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакету програм Microsoft Excel. Відмінність показників порівняно з контролем (бланком) оцінювалися стандартним методом варіаційної статистики та вважалися достовірними при $P < 0,05$.

5. Результати та обговорення

ІФА високочутливий метод дослідження, який дозволяє виявляти аналіти-антигени на субнаномолярному рівні, при цьому, ключовим компонентом у будь-якому варіанті ІФА є використання специфічних антитіл. Тому, першим кроком розробки ІФА діагностичному для виявлення ГМ-рослин стійких до гліфосату, було отримання специфічних антитіл проти ензиму CP4 EPSPS. Для цього ми виділили, клонували ген та отримали рекомбінантний аналог ензиму CP4 EPSPS (неопубліковані дані). Рекомбінантний ензим CP4 EPSPS використовували як антиген для імунізації домашньої курки-несучки (*Gallus gallus*) та отримання специфічних жовткових антитіл (IgY). Ми провели 3 раунди імунізації курки рекомбінантним антигеном CP4 EPSPS, з інтервалом у 10 діб під контролем титрів IgG у непрямому ІФА. На 30-у добу дослідження концентрація IgY (50 мг/мл) в яйці за результатами непрямого ІФА дорівнювало титру IgG в сироватці крові у розведенні 1/20 (рис. 1).

Вирівнювання концентрації IgY в жовтку із титрами IgG в сироватці крові курки дало нам підставу для подальшого афінного виділення специфічних IgY. Для цього нами було синтезовано афінний сорбент, об'ємом 1,0 мл, який ми використовували для нанесення 5 мл розчину IgY (5,5 мг/мл). Після промивання афінного сорбенту проводили елюцію специфічних IgY, на рис. 2 представлений профіль хроматограми афінного виділення специфічних IgY. В цілому ми отримали 7,2 мг афінних IgY, що становить близько 26 % від тотальної кількості жовткових антитіл.

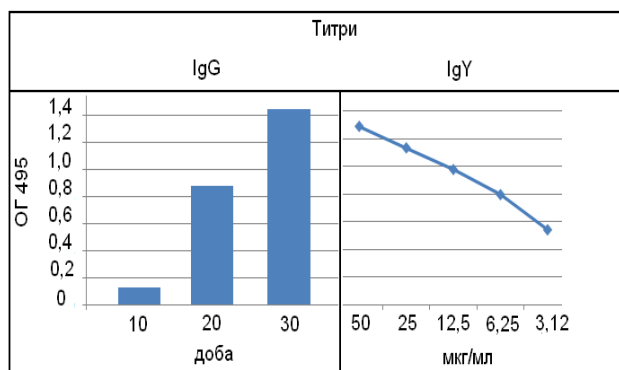


Рис. 1. Дослідження титрів курячих антитіл (IgG та IgY) проти рекомбінантного трансгенного ензиму CP4 EPSPS у непрямому ІФА

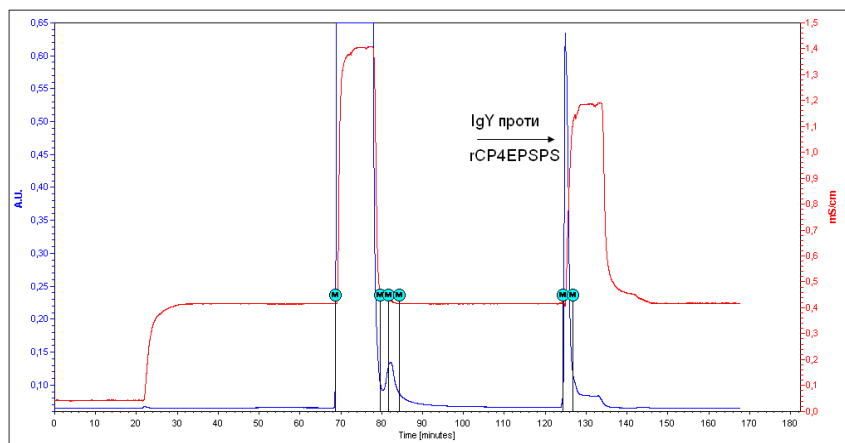


Рис. 2. Хроматограма очищення жовткових антитіл (IgY) на афінному сорбенті Сефароза-6В:rCP4 EPSPS

Афінні антитіла IgY проти рекомбінантного ензиму CP4 EPSPS ми використовували для синтезу кон'югату з пероксидазою хрому та конструювання конкурентного варіанту ІФА.

На рис. 3 представлена схема конкурентного ІФА, де трансгенний ензим CP4 EPSPS, що експресується ГМ-рослинами (зелені трикутники) конкурує з рекомбінантним протеїном (сірі трикутники), який засорбований на полістироловому планшеті, за місця зв'язування з специфічним кон'югатом. У разі відсутності у рослинному екстракті трансгенного ензиму CP4 EPSPS (рис. 3, а) кон'югат взаємодіє з рекомбінантним ензимом, на планшеті та ензиматична активність пероксидази хрому проявляється у вигляді кольорової реакції на кінцевій стадії аналізу. У протилежному випадку, якщо в рослинному екстракті присутній трансгенний ензим CP4 EPSPS, тобто рослина містить ознаки ГМО, кон'югат взаємодіє з трансгенним ензимом та частково вимивається з лунок планшета під час промивання, при цьому кольорова реакція не проявляється (рис. 3, б).

Критичним параметром при розробці конкурентного ІФА є певний титр кон'югату, який визначається експериментально з використанням позитивних та негативних зразків. Шляхом титрування у ІФА вибирається таке розведення кон'югату, яке має максимальне значення оптичної густини (ОГ) при дослідженні негативного зразку та мінімальне значення ОГ при дослідженні позитивного. На рис. 4 представ-

лені криві титрування кон'югату афінних антитіл IgY з пероксидазою хрому при дослідженні позитивного зразку 100 % ГМ-соя (Roundup Ready 40-3-2) та негативно-го зразку сої (сорт Черемош). В даному випадку нами було обрано розведення кон'югату 1/1600.

Після того як нами було визначено титр кон'югату, який дозволяє впевнено дискримінувати 100 % позитивну ГМ-сою від негативної, нами було проаналізовано здатність розробленого конкурентного ІФА кількісно визначати різний вміст ГМО із використанням референс стандартних зразків. Згідно директиви ЕС1829/2003 вміст ГМО в негативних зразках не повинен перевищувати 0,9 %, що є певною межею нижче якої визначення ГМО не має сенсу, оскільки розглядається як випадкове або технічно неминуче [10].

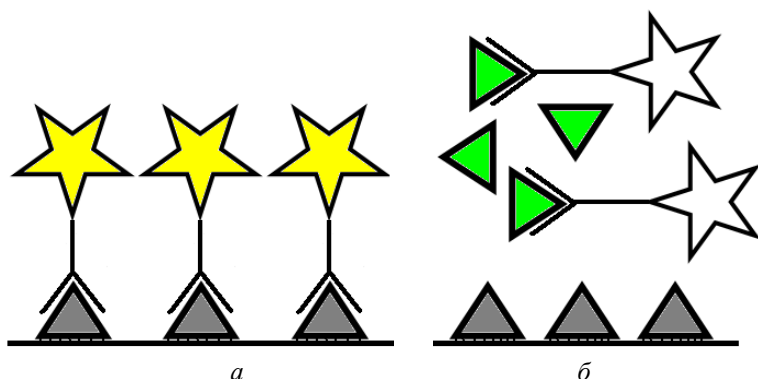


Рис. 3. Принцип конкурентного ІФА (схема): а – у разі відсутності досліджуваного аналіту; б – у разі присутності досліджуваного аналіту (пояснення у тексті)

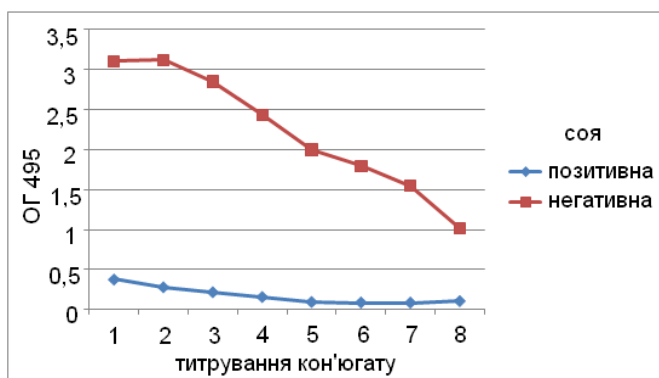


Рис. 4. Титрування кон'югату жовткових антитіл проти CP4 EPSPS, мічених пероксидазою хрому у конкурентному ІФА із використанням позитивної ГМ-сої (RoundUp Ready, 40-3-2) та негативної сої. Розведення кон'югату: 1 – 1/100; 2 – 1/200; 3 – 1/400; 4 – 1/800; 5 – 1/1600; 6 – 1/3200; 7 – 1/6400; 8 – 1/12800

В табл. 1 представлені дані кількісного визначення ГМ-сої у відсотках інгібування (ВІ), за допомогою розробленої тест-системи при використанні сертифікованих стандартів у широкому концентраційному діапазоні (від 0,1–100 %). Продемонстровано, що межею для кількісного визначення вмісту ГМО більше 1,0 % є значення 77,27±1,29 ВІ. Отримані данні у 3-х повторах не перевищує 10 %, що вказує на відтворюваність розробленої методики. При цьому різниця між 1,0 % стандартом ГМ-сої та негативним зразком знаходиться в діапазоні 20 % ВІ, що дозволяє впевнено дискримінувати негативний зразок сої від сої із 1,0 % вмістом ГМ-сої (Roundup Ready, 40-3-2). При цьому ми не спостерігали перекресної реактивності із зразками ГМ-сої, лінії А2704-12 толерантної до іншого гербіциду – фосфінотрицину.

Таблиця 1
Результати кількісного визначення ГМ-сої Roundup Ready, 40-3-2 за допомогою розробленої методики конкурентного ІФА

Рослина	Матриця	Лінія/сорт	СВІ±СКВ*	Інтерпретація, % ГМО
Соя	Референс ст.-т ERM-BF410a	Roundup Ready (Бланк)	57,26±4,29	Негатив
	Референс ст.-т ERM-BF410bk	Roundup Ready	68,27±2,64	Позитив 0,1
	Референс ст.-т ERM-BF410c	Roundup Ready	70,49±1,27	Позитив 0,5
	Референс ст.-т ERM-BF410dk	Roundup Ready	77,27±1,29	Позитив 1,0
	Референс ст.-т ERM-BF410e	Roundup Ready	85,40±1,99	Позитив 2,0
	Референс ст.-т ERM-BF410f	Roundup Ready	90,07±0,73	Позитив 5,0
	Референс ст.-т ERM-BF410gk	Roundup Ready	94,18±0,04	Позитив 10,0
	Референс ст.-т АОСS 0906-В	GenuityRoundup Ready 2 Yield	96,76±0,25	Позитив 100
	Насіння	Liberty Link	60,89±5,56	Негатив
	Насіння	«Черемош»	57,27±0,71	Негатив

Примітка: * – середній ВІ ± середньоквадратичне відхилення

6. Висновки

Таким чином, нами розроблений протокол кількісного ІФА із використанням жовткових антитіл для виявлення ГМ-сої (Roundup Ready, 40-3-2), стійкої до гліфосату з мінімальним граничним значенням 0,1 %.

З огляду на це розроблена методика пропонується як першорядний інструмент для скринінгу ГМ-сої, толерантної до гліфосату (Roundup Ready 40-3-2), яка вирощується на теренах України та стане при нагоді вітчизняним виробникам органічної продукції «GMO-free» згідно ISO 21572:2004 налагодити систему контролю та зайняти одне з провідних місць в цій галузі [8].

Робота виконана в рамках НДР 110/31л-пр «Розробка імуноферментних діагностикумів для виявлення та ідентифікації генетично модифікованих гербіцидостійких сільськогосподарських рослин» № державної реєстрації 00493706 №0113U00382

Література

1. James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM crops: 2011. Vol. 43 [Text] / C. James. – ISAAA Brief. – Ithaca, N. Y., 2011. – 325 p. – Available at: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/download/isaaa-brief-43-2011.pdf>

2. Funke, T. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops [Text] / T. Funke, H. Han, M. Healy-Fried, M. Fischer, E. Schonbrunn // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 103, Issue 35. – P. 13010–13015. doi: 10.1073/pnas.0603638103

3. Barry, G. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases: United States Patent US5633435A [Text] / Barry G., Kishore G., Padgett S., Stallings W.; Assignee: Monsanto Company. – US 08/306,063; Filed: Sep. 13, 1994; Date of Patent: May 27, 1997. – 154 p. – Available at: <http://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US5633435.pdf>

4. Підсумки збору врожаю основних сільськогосподарських культур, плодів, ягід та винограду у 2014 році [Електронний ресурс]. – Експрес-випуск Державної служби статистики України, 2015. – Режим доступу: <http://www.ukrstat.gov.ua/express/expr2015/01/06pdf.zip>

5. Guyton, K. Z. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate [Text] / K. Z. Guyton, D. Loomis, Y. Grosse, F. El Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha et. al. // The Lancet Oncology. – 2015. – Vol. 16, Issue 5. – P. 490–491. doi: 10.1016/s1470-2045(15)70134-8

6. Постанова КМУ № 468 від 13.05.2009 р. «Про затвердження Порядку етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми або вироблені з їх використанням та вводяться в обіг» (зі змінами) [Електронний ресурс]. – Кабінет Міністрів України, 2009. – Режим доступу: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/468-2009-%D0%BF>

7. Наказ МОЗ № 971 від 09.11. 2010 р. «Перелік харчових продуктів, щодо яких здійснюється контроль вмісту генетично модифікованих організмів» [Електронний ресурс]. – Міністерство охорони здоров'я України, 2010. – Режим доступу: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/z1248-10>

8. ISO 21572:2004 Foodstuffs – Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products – Protein based methods [Text]. – Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2004.

9. Pauly, D. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation [Text] / D. Pauly, P. A. Chacana, E. G. Calzado, B. Brembs, R. Schade // Journal of Visualized Experiments. – 2011. – Issue. 51. doi: 10.3791/3084

10. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed (Text with EEA relevance) [Electronic resource]. – Official Journal of the European Union. – 2003. – P. 0001–00023. – Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32003R1829>

References

1. James, C. (2011). Global Status of Commercialized Biotech/GM crops: 2011. Vol. 43. ISAAA Brief. Ithaca, N. Y., 325. Available at: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/download/isaaa-brief-43-2011.pdf>

2. Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M., Schonbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103 (35), 13010–13015. doi: 10.1073/pnas.0603638103

3. Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Stallings, W. (1997). Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases: United States Patent US5633435A. US 08/306,063; Filed: Sep. 13, 1994; Date of Patent: May 27, 1997, 154. Available at: <http://docs.google.com/viewer?url=patent-images.storage.googleapis.com/pdfs/US5633435.pdf>

4. Підсумки збору врожаю основних сільськогосподарських культур, плодів, ягід та винограду у 2014 році (2015). Експрес-випуск Державної служби статистики України. Available at: <http://www.ukrstat.gov.ua/express/expr2015/01/06pdf.zip>

5. Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N. et. al (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. The Lancet Oncology, 16 (5), 490–491. doi: 10.1016/s1470-2045(15)70134-8

6. Постанова КМУ № 468 від 13.05.2009 р. «Про затвердження Порядку етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми або вироблені з їх використанням та вводяться в обіг» (зі змінами) (2009). Кабінет Міністрів України. Available at: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/468-2009-%D0%BF>

7. Наказ МОЗ № 971 від 09.11. 2010 р. «Перелік харчових продуктів, щодо яких здійснюється контроль вмісту генетично модифікованих організмів» (2010). Міністерство охорони здоров'я України. Available at: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/z1248-10>

8. ISO 21572:2004 Foodstuffs – Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products – Protein based methods (2004). Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

9. Pauly, D., Chacana, P. A., Calzado, E. G., Brembs, B., Schade, R. (2011). IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. Journal of Visualized Experiments, 51. doi: 10.3791/3084

10. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed (Text with EEA relevance) (2003). Official Journal of the European Union, 0001–00023. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32003R1829>

Дата надходження рукопису 19.10.2015

Спирidonov Владислав Геннадійович, доктор сільськогосподарських наук, заступник директора, Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК, Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: spurydonov@ukr.net

Хоменко Ярослав Васильович, аспірант, провідний фахівець, Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК, Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: iarikkiev7@gmail.com

Іщенко Вадим Дмитрович, кандидат ветеринарних наук, доцент, кафедра фармакології та токсикології, Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: ischenko_vd@nubip.edu.ua

Гончаренко Василь Сергійович, старший науковий співробітник, Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК, Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: goncharenko_vs@ukr.net

Шимко Наталія Миколаївна, старший науковий співробітник, Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК, Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: natashim@ukr.net

Рибальченко Дмитро Юрійович, науковий співробітник, Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК, Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: doctordimafish@gmail.com

УДК 608.5:577.171.4

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.53805

ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА ЗБЕРЕЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ХГЛ ВПРОДОВЖ ТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ В РОЗЧИНЕНОМУ ВИГЛЯДІ

© Ю. І. Сливчук, І. О. Матюха, В. Я. Сирватка, І. І. Гевкан, О. В. Штапенко, Н. І. Брода

Досліджено активність нових форм лікарських препаратів стабілізованих гонадотропінів при тривалому зберіганні. Встановлено, що диспергування призводить до втрати 10–12 % активності гонадотропіну проте, тривалість диспергування на неї не впливає. Додані стабілізатори і ліпосомальна форма препарату зберігають активність ХГл при температурі 18–20 та 2–4 °С на рівні 80 %

Ключові слова: хоріонічний гонадотропін, стабілізація, сахароза, L-лізин, ліпосомальна емульсія, активність гормону

The activity of new forms of drugs stabilized gonadotropins during prolonged storage was studied. It is established that dispersion leads to loss of 10–12 % the activity of gonadotropin, but the duration of dispersion is not affected. Added stabilizers and liposomal form of the drug maintains the hCG activity at a temperature of 18–20 °C and at 2–4 at the level near 80 %

Keywords: chorionic gonadotropin, stabilization, sucrose, L - lysine, liposomal emulsion, hormone activity

1. Вступ

У повсякденному процесі корекції безпліддя очевидним вагомим компонентом є гормональна стимуляція та терапія. Ранні відкриття з виявлення фізіологічної дії гонадотропінів у нормальному циклі яєчників спонукали багатьох вчених шукати гонадотропні екстракти достатньої чистоти, щоб забезпечити лікування безпліддя [1, 2]. Корекція репродуктивних процесів виникла з перших спроб отримати і очистити гонадотропні препарати тваринного і людського походження. Перші спроби лікування безпліддя були зроблені майже 100 років назад. Еволюційний процес розвитку гонадотропної терапії був обумовлений необхідністю зробити гонадотропні препарати безпечними, максимально очищеними і

ефективними не лише в лікуванні, але й в простоті використання, щоб звести до мінімуму безліч можливих відмінностей у лікуванні безпліддя [3].

2. Аналіз літературних даних та постановка проблеми

До групи гонадотропінів відносять хоріонічний гонадотропін (ХГ), фолікулостимулюючий гормон (ФСГ; фолікотропін), лютеїнізуючий гормон (ЛГ; лютропін). ФСГ і ЛГ синтезуються гіпофізом більшості ссавців, тоді як ХГ синтезується плацентарною тканиною приматів і коней. В останні роки, структура гонадотропних гормонів була декодована для різних видів риб, тварин і людини [1–7]. Молекули гонадотропінів різних видів тварин і людини, во-