

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

Ташкентский химико-технологический институт

Ибрагимов Аваз Бахтиярович

**Освоение метода определения генно-модифицированных организмов в пищевых
продуктах с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени.**

Дипломная работа

по направления: 5522900- Биотехнология

Научный руководитель:

проф. Ташмухамедов М.С

Ташкент – 2012 г.

Содержание

Список сокращений.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	6
1.1. Генетически модифицированные организмы и методы их получения.....	6
1.2. Ограничения и риски генетической инженерии	8
1.3. Сферы применения ГМО и потенциальные риски, связанные с их использованием.....	10
1.3.1. ГМО и сельское хозяйство.....	10
1.3.2. ГМО и риски для здоровья человека.....	19
1.4. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР).....	20
ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	25
2.1. Объекты исследований.....	25
2.2. Сбор материала.....	26
2.3. Выделение ДНК.....	27
2.4. Проведение электрофореза.....	29
2.5. Проведение ПЦР-амплификации в режиме реального времени.....	31
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	34
3.1. Обоснование полученных результатов.....	34
3.2. Сухой суповой набор.....	35
3.2.1 Обсуждение результатов.....	38
3.3 Бутылочный чай с различными ингредиентами.....	38
3.3.1 Обсуждение результатов.....	38
Выводы.....	39
Список литературы.....	40

Список сокращений

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ГМО – Генетически модифицированный организм

ГМ – Генетически модифицированный

ВТ – *Bacillus thuringiensis*

ОКО – Отрицательный контрольный образец

УФ-свет – ультрафиолетовый свет

Введение

Актуальность работы. Генетически модифицированные организмы (ГМО) – продукт научно-технического развития последних десятилетий. Современная биотехнология создала возможности внедрения человека в самые сокровенные механизмы природы, обеспечивающие сохранение и передачу наследственности от поколения к поколению. То, что создавалось миллионами лет как результат дарвиновской эволюции, ныне может подвергнуться и подвергается манипуляциям и изменениям, результаты и последствия которых не всегда можно с уверенностью предсказать. Такое развитие событий вызывает обоснованное беспокойство мировой общественности и ученых, видящих необходимость разработки и внедрения на международном уровне механизмов контроля за результатами биотехнологической деятельности, чтобы по возможности избежать ущерба природной среде, здоровью людей, а также негативных последствий для общества и экономики стран, в которые проникают ГМО и продукты, полученные из них. Особенно эта проблема актуальна для государств, в которых сельское хозяйство занимает существенную роль в национальной экономике. В настоящее время ГМ-культуры выращиваются в 25 государствах мира, и ещё в 32 странах они были разрешены для ввоза, применения в качестве продуктов питания и кормов и выпуска в окружающую среду. По данным CliveJames, ISAAA SEAsiaCenter площадь посевов ГМ культур в различных странах составляет 134 миллиона гектар.

Рост населения планеты несомненно ведёт к увеличению потребления ГМО, и поэтому как производители, так и потребители продуктов питания, содержащих ГМО должны владеть достоверной информацией о безопасности их применения.

Цели и задачи исследования. Целью работы является освоение методов и способов определения наличия ГМО в продуктах питания.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи исследования:

1. Выделение ДНК из образцов пищевых продуктов, имеющих в розничной продаже.
2. Освоение метода гель электрофореза для визуализации выделенной ДНК.
3. Освоение метода ПЦР в реальном времени для детекции ГМО в исследуемых образцах.

Глава I. Литературный обзор

1.1. Генетически модифицированные организмы и методы их получения

Генетически модифицированный организм (ГМО) – это любой организм, за исключением организма человека, обладающий новой комбинацией генетического материала и полученный благодаря использованию методов современной биотехнологии. Основной целью получения ГМО является улучшение полезных характеристик организма-реципиента (например, повышение устойчивости растения к гербицидам, насекомым-вредителям, патогенным микроорганизмам и т.д.) для снижения себестоимости конечного продукта. Создание ГМО является результатом «генной революции», связанной с разработкой методов выделения, размножения, переноса и экспрессии генов одного организма в клетках другого.

Основные этапы «генной революции», приведшей к созданию ГМО:

- **1953 год.** Учёные Дж Уотсон (США) и Ф. Крик (Англия) предложили модель строения ДНК, позволяющую дать химическое объяснение биологическим свойствам этого вещества как носителя генетической информации.
- **1970 год.** Г. Корана (США) впервые синтезировал полную двухцепочечную молекулу ДНК, включающую последовательность из 77 нуклеотидов (компоненты, из которых состоят нуклеиновые кислоты) и доказал, что она может служить матрицей для построения аланиновой транспортной РНК.

- **1970 год.** Г. Смит (США) выделил из клеток ферменты – рестриктазы, способные избирательно разрезать молекулы ДНК и РНК на отдельные фрагменты. Открытие рестриктаз являлось важным практическим шагом к созданию рекомбинантных молекул ДНК.

- **1972 год.** В лаборатории П. Берга (США) была получена первая рекомбинантная молекула ДНК (рек ДНК), в которой были соединены фрагменты фага лямбда (фаги – это вирусы, поражающие бактерии), галактозный оперон (набор генов, ответственных за расщепление молочного сахара лактозы) бактерии *Escherichiacolic*, кольцевой ДНК обезьяньего вируса SV 40.

- **1973 год.** В лаборатории Г. Бойера и С. Коэна (США) была получена первая функционально активная молекула рекомбинантной ДНК, за счёт соединения плазмиды (небольшие кольцевые молекулы ДНК, характерные для клеток бактерий и способные к самостоятельному размножению) *E. Coli* и фрагмента ДНК плазмиды другой бактерии. Полученная гибридная плазида могла успешно функционировать в клетках *E. coli*, размножаться и передаваться другим клеткам как естественным путём, так и с помощью человека. С появлением методов создания рекомбинантных (химерных) ДНК появилась возможность изменять живые организмы в практических целях, внедряя в них гены других организмов. Для создания таких химер разработана целая система методических приёмов. В качестве «инструмента» для манипуляций с ДНК широко используются белки-ферменты: рестриктазы; лигазы; полимеразы. С их помощью молекулы ДНК разрезают, сшивают или получают их копии. Основным орудием генно-инженерных работ являются векторы. Это молекулы ДНК, способные переносить, размножать и хранить генетическую информацию. Вектор – своеобразное транспортное средство для переноса чужеродной ДНК в реципиентные клетки. В качестве векторов в генной инженерии используют небольшие по размерам молекулы ДНК плазмид, вирусов и фагов, а также митохондрий и пластид (клеточные органеллы).

1.2. Ограничения и риски генетической инженерии

При оценке возможностей генетической инженерии важно учитывать те ограничения и опасности, которые вытекают из законов генетической и экологической изменчивости живых организмов. Известно, что генетическая сложность цветковых растений на много порядков выше, чем у бактерий. При этом изолирующие барьеры, обуславливающие межвидовую и половую несовместимость у высших растений, весьма многочисленны. Поскольку многие закономерности генетической инженерии неизвестны и мы не знаем, сколько времени потребуется на их познание. Поэтому было бы весьма опасным пренебрегать традиционными методами селекции, которые сегодня кормят население земли. Высоко оценивая потенциальную роль генетической инженерии в селекции растений, особенно в плане преодоления барьеров несовместимости любого уровня, следует, однако, учитывать ограничения и риски, обусловленные спецификой и сложностью генно-инженерных работ.

Причины биологических рисков ГМО:

1. Полигенность признаков. Большинство хозяйственно ценных и адаптивно значимых признаков являются полигенными по своей природе, так как их проявление контролируется множеством ядерных и цитоплазматических генов. Из более 50 тыс. генов, контролирующих признаки высших растений, лишь у некоторых видов изучены 200-300 генов (находящихся в хромосомах), большинство же адаптивно и хозяйственно ценных признаков генетически не идентифицированы (не определены гены, которые за них отвечают) и биохимически не охарактеризованы. Методы генетической инженерии разработаны пока только для небольшого числа культур.

2. Непредсказуемость (случайность) встраивания чужеродного фрагмента ДНК (например, ДНК бактерии, человека или рыбы) в геном организма-реципиента (растения). Это один из основных недостатков

генно-инженерной технологии. В настоящее время учёные не умеют «вставлять» чужеродный фрагмент ДНК в конкретное место генома организма-реципиента. Ситуация усугубляется ещё и тем, что механизмы функционирования генетического аппарата высших организмов изучены пока недостаточно хорошо.

3. Плейотропный эффект встроенного гена. Работа встроенного чужеродного гена, так же как и работа окружающих его «хозяйских» генов, во многом зависит от того, в какое место хромосомы попадёт чужеродный фрагмент ДНК. Следствием данной ситуации может быть не прогнозируемое изменение работы генетического аппарата клетки, возможные нарушения обмена веществ в клетке и синтез токсичных или аллергенных соединений, ранее несвойственных клетке.

4. Нарушение стабильности генома и изменение его функционирования вследствие самого факта переноса чужеродной информации в виде фрагмента ДНК. Согласно данным бельгийских учёных, даже самые распространённые коммерческие сорта растений (например, трансгенная соя фирмы Monsanto, устойчивая к гербициду раундапу) не сохраняет генетической стабильности после трансформации исходного растения и, следовательно, являются потенциально опасными для здоровья человека и окружающей среды.

5. Нарушение стабильности встроенного в геном чужеродного фрагмента ДНК. Клетки высших организмов имеют сложные и эффективные системы распознавания и подавления функционирования чужеродной ДНК.

6. Наличие во встраиваемом фрагменте ДНК «технологического» мусора, например, генов устойчивости к антибиотикам, которые также могут привести к нежелательным последствиям.

7. Аллергические и токсические эффекты чужеродного белка. Все эти, а также ряд других недостатков современных методов получения ГМО,

являются источниками серьёзных реальных и потенциальных биологических и экологических рисков, пренебрегать которыми просто невозможно. Отсюда следует, что широкомасштабное (коммерческое) использование ГМО и полученных из них продуктов питания допустимо лишь тогда, когда **производитель** предоставит исчерпывающие доказательства их полной (как реальной, так и потенциальной) биологической безопасности

1.3. Сферы применения ГМО и потенциальные риски, связанные с их использованием

1.3.1 ГМО и сельское хозяйство

В настоящее время на полях мировых сельхозугодий культивируются десятки тысяч сортов культурных растений, относящихся к более чем пяти тысячам видам. Всё это сортовое разнообразие получено благодаря использованию методов традиционной селекции, основанной на гибридизации (скрещивании) различных сортов или селекционных линий одного вида, обладающих какими-либо ценными признаками (высокая продуктивность; устойчивость к болезням и вредителям; улучшенные потребительские качества и т.д.). Чем выше генетическая изменчивость внутри вида (широкий выбор селекционно-ценных генов), тем, как правило, выше эффективность селекции. Однако есть виды сельскохозяйственных растений, у которых естественная внутривидовая изменчивость невысока (например, свекла). Многие селекционно-ценные гены могут вообще отсутствовать у культурных видов растений (например, гены устойчивости к некоторым болезням, вредителям). Поэтому в селекции получили широкое применение методы, направленные на расширение генетического разнообразия вида с помощью экспериментального мутагенеза (искусственное получение мутаций в результате воздействия физических или химических факторов) или отдалённой гибридизаций (скрещивания между представителями разных видов, родов или более отдалённых таксонов). Однако широкое применение этих методов ограничено негативными

эффектами индуцированных мутаций и репродуктивными барьерами, препятствующими свободному скрещиванию между представителями разных таксонов. Генетическая инженерия даёт возможность в значительной мере обойти все естественные межвидовые репродуктивные и рекомбинативные (рекомбинация–процесс, приводящий к обмену генами между хромосомами) барьеры. Она позволяет манипулировать (комбинировать, переносить от одного вида к другому) любыми генами, принадлежащими совершенно не родственным организмам или даже синтезированным искусственно. Начиная с 80-х годов прошлого столетия, появились и стали выращиваться в коммерческих целях жизнеспособные в природных условиях трансгенные организмы. Полученные генно-инженерными методами формы (сельскохозяйственные сорта растений и породы животных, штаммы микроорганизмов и т.д.) обладают целым рядом новых качеств (устойчивость к пестицидам, болезням и вредителям; длительность хранения и пищевая ценность), которые невозможно было бы передать методами традиционной селекции.

Первые масштабные посевы ГМ-культур были произведены в 1996 году в США. На сегодняшний день число трансгенных сортов исчисляется сотнями и охватывает около 50 культивируемых видов растений, но лишь четыре культуры – соя, кукуруза, хлопчатник и рапс – составляют фактически 100% мировых посевов всех ГМ – культур. При этом общая площадь полей, занятых ГМ – культурами, составляет порядка 80 млн. Основная цель коммерческого использования ГМ-культур - это рост доходов фирм-разработчиков ГМ-культур за счет продажи посадочного материала, и сельхозпроизводителей за счёт снижения издержек производства и увеличения продуктивности растений. Сторонники ГМ – технологий в сельском хозяйстве считают, что кроме финансовых выгод, выращивание трансгенных сортов растений несёт ощутимые социальные и экологические выгоды, в том числе:

- увеличение сельскохозяйственной производительности и, таким образом, вклад в обеспечение глобальной продовольственной безопасности и сокращение бедности в развивающихся странах;
- сохранение биологического разнообразия, так как ГМ-технологии из-за высокой производительности требуют меньших сельскохозяйственных площадей;
- уменьшение выбросов углекислого газа в атмосферу за счёт сокращения эксплуатации сельскохозяйственной техники, используемой для вспашки и обработки полей пестицидами;
- снижение химической загрязнённости воды и почвы вследствие использования менее вредных для окружающей среды гербицидов;
- предотвращение эрозии почвы, поскольку использование ГМ-культур, устойчивых к гербицидам, позволяет перейти на щадящий (без пахотный) метод обработки почвы;
- увеличение биоразнообразия, за счёт использования сортов с избирательной устойчивостью к насекомым вредителям. Однако многие из этих аргументов подвергаются сомнению и критике учеными и общественностью, поскольку при проверке заявленные эффекты часто не подтверждаются. В настоящее время, сложились несколько основных направлений создания и использования ГМ-культур, каждое из которых имеет как свои потенциальные преимущества, так и риски связанные с их использованием:
- **Устойчивость (толерантность) к гербицидам.** Устойчивость к гербицидам достигается за счёт переноса культурным сортам мутантного бактериального гена почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (CP4), отвечающего за синтез фермента, обуславливающего устойчивость к действию гербицида. Устойчивость трансгенного сорта к определённому гербициду (глифосату и глюфозинату) позволяет фермерам опрыскивать

культуры этим гербицидом, уничтожая сорняки без вреда для самого культурного растения.

Потенциальные преимущества:

- Эффективное управление сорняками и увеличение доходов за счёт снижения трудовых затрат.
- Уменьшение использования гербицидов за счёт сокращения заявок на их поставки.
- Увеличение урожая за счёт увеличения контроля над сорными растениями и повышение доходов.
- Использование новых (менее вредных) видов гербицидов взамен токсичных и химически устойчивых видов.

Потенциальные и реальные риски:

- Может произойти передача гена устойчивости к гербициду родственным диким видам, что позволит превратиться им в гербицида-устойчивые «супер-сорняки». Это зависит от близости видов, с которыми трансгенные растения могут успешно скреститься. Например, в Индии устойчивость к гербицидам ГМ-рапса передалась дикой горчице, которая в результате стала важным сорняком рапса.
- ГМ-культуры сами могут стать «супер-сорняками» и распространяться на другие территории, вытесняя другие культуры или скрещиваясь с ними.
- Увеличение использования специфических гербицидов на ГМ-полях может привести к появлению гербицида-устойчивых форм сорных растений. Уже известно более 40 видов сорных растений, которые очень быстро приобрели устойчивость к производным сульфонил мочевины (вид гербицида). Зарегистрирован ряд видов злаковых и бобовых сорняков устойчивых к глифосату. Например, из посевов ГМ-сои в США, через три года после их обработки глифосатом, была выделена устойчивая к гербициду

популяция злостного сорняка мелколепестника канадского (Conizacanadensis).

- Широкое распространение гербицида-устойчивых сортов увеличивает масштабы применения гербицидов и вытесняет альтернативные (органические) методы борьбы с сорной растительностью (например, многовидовые «поликультурные» севообороты, разные способы обработки почвы, без гербицидных технологий и т.д.).

- Граница с посевами фермеров, ведущих экологическое (органическое) производство и переработку, ГМ-культуры смогут опылять их и привести к генетическому загрязнению чужеродными генами, что принесет большой экономический ущерб.

- Снижение сортового разнообразия. Особо опасно выращивание ГМ-культур в центрах происхождения сельскохозяйственных культур. Например, если выращивать ГМ-рис в Китае, где зародилась эта культура, то из-за перекрестного опыления могут исчезнуть дикие сорта риса.

- **Устойчивость к насекомым-вредителям.** Устойчивость ГМ-культур к насекомым вредителям достигается внесением гена, вызывающего выработку инсектицидного токсина (такого как токсин Vt из бактерии *Bacillus thuringiensis*). Vt-токсин представляет собой протеин (белок) с высокой избирательностью действия. Это значит, что Vt-протеин, выделенный из определённого штамма бактерии, способен поражать определённый вид насекомого-вредителя и не действует на других насекомых. Наибольших успехов в создании Vt-сортов удалось достичь на картофеле, кукурузе и хлопке.

Потенциальные преимущества:

- Уменьшение объёма химического инсектицида, используемого во время посева.

- Повышение урожайности за счёт уменьшения ущерба, приносимого вредителями и рост доходов фермеров.
- Сокращение основного ущерба «до» и «после» снятия урожая в результате использования инсектицидов, применяемых для предотвращения проникновения болезнетворных организмов в культуру.

Потенциальные и реальные риски:

- Произойдёт передача гена устойчивости к насекомым-вредителям, родственным диким видам, что позволит им превратиться в инсектицида-устойчивые «супер-сорняки». Вероятность этого зависит от близости видов, с которыми трансгенные растения могут успешно скреститься.
- Инсектицидные культуры будут уничтожать нецелевые (полезные) виды насекомых. Bt-токсин, выделяемый трансгенными формами картофеля поражает не только колорадского жука, но и 150 других видов насекомых, не поедающих картофель.
- Переход вредителей на новые культуры. Сорты растений, модифицированные с помощью ГМ-технологий, станут непривлекательными для вредителей (например, картофель с помощью Bt-токсина), то это может подтолкнуть вредителей к освоению новых, ранее массово не поражаемых таксономически близких видов растений (для колорадского жука – других паслёновых - томатов, перца, баклажанов).
- Нарушение естественного контроля вспышек численности вредителей. В природе у каждого вида есть естественные враги и паразиты, не позволяющие этому виду чрезмерно размножаться. Воздействие токсинов ГМ-растений на хищных и паразитических насекомых может привести к серьезным нарушениям в экосистемах, в том числе к неконтролируемым вспышкам численности одних видов и вымиранию других. Известны случаи нарушения процессов роста и жизнедеятельности представителей одного

вида божьих коровок, основной пищей которых являлись личинки, выращенные на трансгенном картофеле.

- У насекомых-вредителей начнёт развиваться устойчивость к инсектицидам, что со временем станет причиной снижения урожая и использования новых, более мощных, инсектицидов. Исследования в США и Франции показали, что у мутантных устойчивых к Cry1Ab-токсину особей кукурузного мотылька (**Ostrinia nubilalis**), при постоянном содержании токсинов в пище устойчивость к Bt-токсину увеличилась в 32 раза.

- Граница с посевами фермеров, ведущих экологическое (органическое) производство и переработку, **ГМ-культуры смогут опылять их и привести к генетическому загрязнению чужеродными генами.**

- **Устойчивость к вирусным, грибковым и бактериальным болезням.**

Современные генно-инженерные технологии создания устойчивых к вирусам сортов растений базируются на использовании метода перекрестной защиты (cross protection). Он основан на явлении повышенной устойчивости растений к агрессивным формам какого-либо вируса при условии, что они были заражены менее вредоносной формой того же самого вида вирусов.

В 1986 году П. Абель в первый раз получил устойчивую к мозаичному табаку вирусом форму табака путём переноса в геном растения гена этого вируса, кодирующего образование белка оболочки (coat protein – CP). С тех пор этот подход был успешно апробирован на многих растениях (свыше 30 видов) и с более чем 50 вирусными CP. Позднее оказалось, что аналогичный, а иногда даже лучший результат достигается при использовании не CP-генов, а генов, кодирующих другие белки вирусов – ферментов репликазы, РНКазы.

Из всего разнообразия полученных вирусостойчивых форм для коммерческого использования допущены сравнительно немногие: папайя, устойчивая к вирусу пятнистости; две формы цуккини, устойчивые к нескольким вирусам и сорта картофеля с комплексной устойчивостью к

колорадскому жуку (Bt-ген) и к одному из вирусов картофеля: игрек вирусу (PVY) или вирусу скручивания листьев (PLRV).

Потенциальные преимущества:

- Сокращение потерь урожая, увеличение доходов сельхозпроизводителей.
- Снижение расходов на приобретение и использование пестицидов.

Потенциальные риски:

- Передача генов устойчивости к вирусам, бактериям и грибкам к родственным дикорастущим видам и возникновение устойчивых к болезням «супер-сорняков».
- Возникновение новых форм вирусов. Вирусы могут стать более агрессивными и /или менее видо-специфичными (например, вирусы растений могут стать опасными для животных).
- Грибки и бактерии смогут выработать устойчивость против ГМ-культур, что потребует создания новых устойчивых к болезням трансгенных форм растений.
- Гранича с посевами фермеров, ведущих экологическое (органическое) производство и переработку, ГМ-культуры смогут опылять их и привести к генетическому загрязнению чужеродными генами.
- **Улучшенные качественные характеристики.** Создание трансгенных сортов растений с улучшенными качественными характеристиками основано на введении в геном растения дополнительных копий определённых собственных генов, что приводит к существенному ослаблению их активности. В свою очередь, это может привести к изменению качественных характеристик того продукта, в генетическом контроле биосинтеза которого задействованы данные гены. Так, качество растительного масла зависит от соотношения в нём различных жирных кислот. Внедрение в геном сои дополнительной копии гена фермента десатуразы привело к тому, что

собственный ген десатуразы перестал работать. Это вызвало снижение в соевом масле уровня полиненасыщенных жирных кислот и привело к компенсационному увеличению уровня мононенасыщенной жирной кислоты. Полученное масло превосходит по своим потребительским качествам масло традиционных сортов, в частности, оно более стабильно при нагревании и не загустевает.

Трансгенные сорта картофеля с улучшенным качеством крахмала отличаются от традиционных высоким содержанием амилопектина (ветвистая форма молекулы крахмала) и низким уровнем амилозы (неветвистая форма молекулы крахмала). Это достигается за счёт добавки инвертированной (перевернутой) копии гена амилазы. Трансгенный сорт томата «Flavr savr» отличается от исходного удлинённым периодом хранения плодов. Гниение спелых плодов связано с действием фермента полигалактуроназы, который разрушает пектин, находящийся в межклеточном пространстве плода. В результате введения в геном растения дополнительной копии гена, кодирующего этот фермент, удалось резко снизить его концентрацию и увеличить время хранения плодов.

Потенциальные преимущества:

- Появление дешёвых источников жирных кислот для использования их в пищевых и технических целях.
- Получение более полезных по своим питательным свойствам продуктов.
- Снижение затрат на производство крахмала.
- Увеличение сроков хранения и реализации плодов.

Потенциальные риски:

- Неожиданные изменения качества сырья может поставить под угрозу безопасность продуктов питания.

- По комплексу белков, витаминов, незаменимых аминокислот пищевые трансгенные продукты будут такими же, как обычные или даже хуже.
- Ухудшатся экспортные возможности в страны, требующие этикетирования продуктов, полученных с использованием ГМО.

1.3.2. ГМО и риски для здоровья человека

Одной из наиболее обсуждаемых и спорных проблем, связанных с использованием и распространением ГМО, стала проблема потенциального влияния ГМ-продуктов (продукты, полученные из ГМО или содержащие их ингредиенты) на здоровье человека. Ситуация усугубляется тем, что полный комплекс исследований о влиянии ГМО на организм человека и животных еще не проведен. Оценка пищевых рисков от потребления ГМ-продуктов сейчас возможна только на основании отрывочных данных и разрозненных научных фактов. По мнению экспертов, для того, чтобы идентифицировать все риски, связанные с ГМО, нужно изучить последствия выращивания и разведения ГМО во всех условиях, а также воздействие ГМ-продуктов на все группы живых организмов (животных, растений, грибов и простейших), проследить возможные генетические, тератологические, иммунологические и эндокринологические изменения во всех системах органов, всех этнических и поло-возрастных группах людей. Ни теоретически, ни практически такие исследования провести невозможно. Именно поэтому многие ученые опасаются, что использование в пищу ГМ-продуктов увеличивает риск возникновения пищевых аллергий, отравлений, мутаций, способствует образованию опухолей, а также вызывают невосприимчивость к антибиотикам.

ГМ-продукты можно разделить на три категории:

- Продукты, содержащие ГМ-ингредиенты (в основном, трансгенная кукуруза и соя). Эти добавки вносятся в пищевые продукты в качестве структурирующих, подслащивающих, красящих веществ, а также в качестве веществ, повышающих содержание белка.

- Продукты переработки трансгенного сырья (например, соевый творог, соевое молоко, чипсы, кукурузные хлопья, томатная паста).
- Трансгенные овощи и фрукты, а в скором будущем, возможно, и животные, непосредственно употребляемые в пищу. Кроме того, к самостоятельной категории, по-видимому, следует отнести пищевые продукты, сделанные из животных, вскормленных на ГМ-продуктах.

Аллергия на продукты питания – явление достаточно распространённое и неуклонно растущее среди населения развитых стран. Это связано, в первую очередь, с неблагоприятной экологической обстановкой, изменением традиционного рациона питания и современными технологиями пищевой промышленности, приводящими к повышенному содержанию в пище химических добавок и консервантов. Как правило, аллергическим или токсическим действием обладают трансгенные белки, обеспечивающие устойчивость растений реципиентов к поражению различными видами насекомых, грибковыми или бактериальными заболеваниями.

1.4. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР)

Изобретение полимеразной цепной реакции (ПЦР) К.Муллисом (К.Mullis) и его сотрудниками в 1985 году революционизировало молекулярную биологию и молекулярную медицину (Saiki et al., 1985). Полимеразная цепная реакция – это метод *in vitro*, используемый для того, чтобы ферментативно амплифицировать (умножить) специфический участок ДНК, расположенный между двумя участками ДНК с известной последовательностью. В то время, как прежде можно было получить только минимальные количества специфического гена, теперь с использованием ПЦР даже единичная копия может быть амплифицирована до миллиона копий за несколько часов. Методика ПЦР стала необходимой для многих обычных процедур, таких как клонирование специфических фрагментов ДНК, выявление и идентификация генов в диагностике и в судебной медицине, а также в процессе изучения характера экспрессии генов. В

настоящее время в практическое здравоохранение внедряется новая технология ПЦР — ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ, Real-Time PCR). Ее принципиальной особенностью является мониторинг и количественный анализ накопления продуктов полимеразной цепной реакции, а также автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Этот метод не требует стадии электрофореза, что позволяет снизить требования, предъявляемые к ПЦР лаборатории. Благодаря экономии производственных площадей, уменьшению количества персонала и востребованности количественного определения ДНК/РНК этот метод в последние годы успешно применяется в крупнейших санитарно-эпидемических, диагностических и научно-исследовательских центрах развитых стран мира.

Метод ПЦР относится к гибридизационным методам анализа ДНК. В основе метода ПЦР лежит природный процесс — комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Этот процесс носит название репликации ДНК.

Естественная репликация включает в себя несколько стадий:

1. Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК);
2. Образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок необходимых для инициации синтеза ДНК)
3. Синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей)

ПЦР представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза (амплификацию) специфической области ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеотидтрифосфатов, соответствующего солевого буфера и олигонуклеотидных затравок-праймеров, которые определяют границы амплифицируемого участка. Каждый цикл состоит из трех стадий с различными температурными режимами. На первой стадии при $+94^{\circ}\text{C}$ происходит разделение цепей ДНК, затем при $+56^{\circ}\text{C}$ - $+60^{\circ}\text{C}$ — присоединение (отжиг) праймеров к

комплементарным последовательностям на ДНК-мишени, и при температуре +72°C протекает синтез новых цепей ДНК путем достраивания цепей праймеров в направлении 5' - 3'. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет за 25-40 наработать фрагмент ДНК, ограниченный парой выбранных праймеров, в количестве, достаточном для ее детекции с помощью электрофореза или альтернативными ему технологиями.

Открытие термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы) из термофильных бактерий *Thermis aquaticus*, оптимум работы которой находится в области 70-72°C, позволило сделать процесс репликации ДНК циклическим и использовать его для работы *in vitro*. Создание программируемых термостатов (амплификаторов), которые по заданной программе осуществляют циклическую смену температур, создало основу для широкого внедрения метода ПЦР в лабораторную практику. При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов получить достаточное количество ДНК-копий для их идентификации.

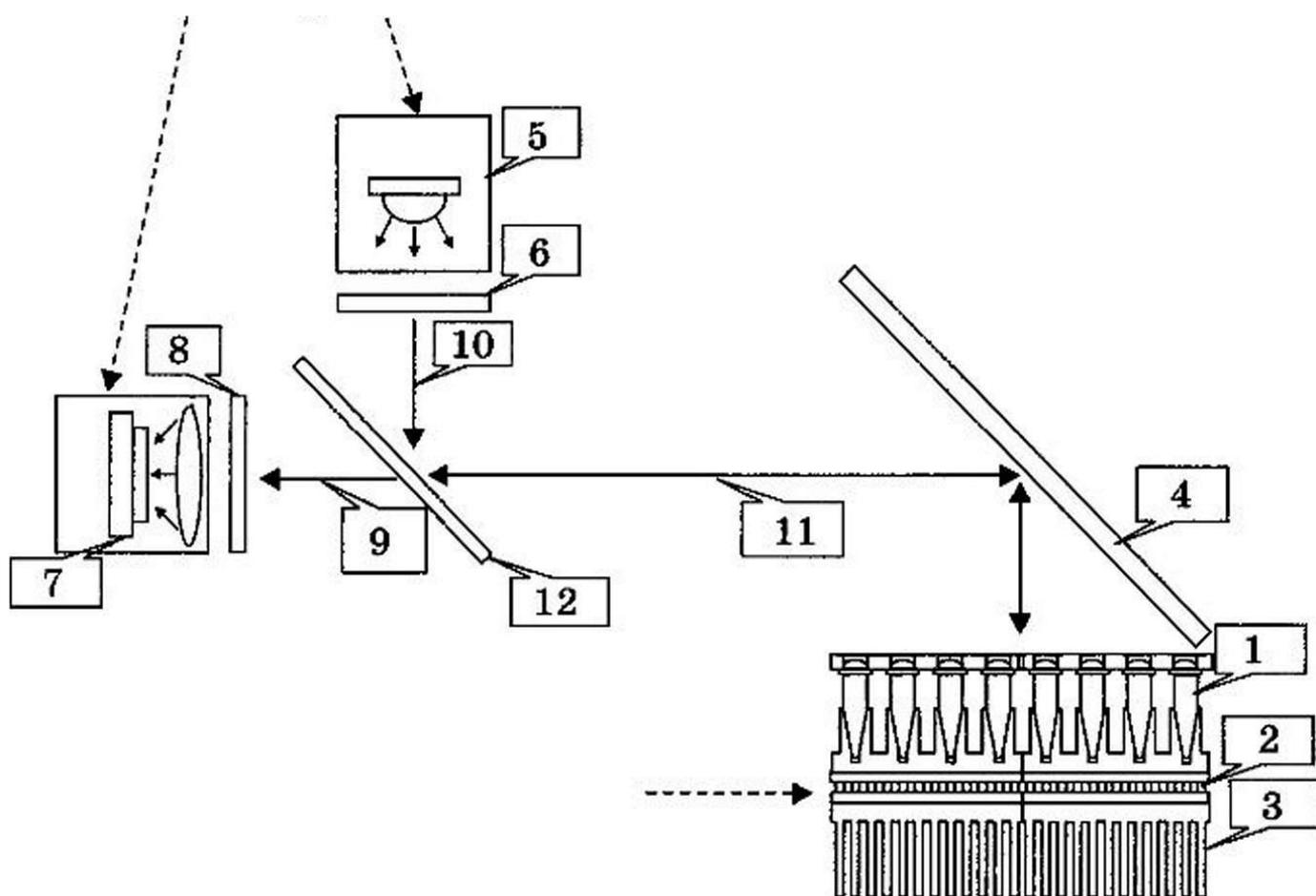
Комплементарное достраивание цепи начинается не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках – коротких двунитевых участках. При перисоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК можно направить процесс новой цепи только в этом участке, а не по всей длине ДНК цепи. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки (20 нуклеотидных пар), называемые праймерами. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними.

Таким образом, ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий специфического участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой.

Преимущества метода ПЦР:

- Высокая специфичность;
- Высокая чувствительность;
- Высокая скорость получения результата анализа;

Преимуществом ПЦР-диагностики является относительно низкая стоимость оборудования и тест- систем для проведения анализа, которые сочетаются с универсальностью метода.



Электроника и источники питания ТЭ модулей
Схема организации детектирующего амплификатора

1 — пробирки; 2 — термоэлектрические (ТЭ) модули (элементы Пельтье); 3 — радиатор; 4 — зеркало; 5 — источник света возбуждения флуоресценции; 6 — светофильтр источника возбуждения; 7 — детектор излучения флуоресценции; 8 — светофильтр детектора; 9 — излученный световой поток; 10 — световой поток возбуждения; 11 — суммарный световой поток; 12 — спектроделитель

ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследований

В работе в качестве объектов исследований была использована ДНК, выделенная из продуктов питания.

Методы идентификации ГМО

Увеличение использования ГМО и их компонентов в производстве продуктов питания, сельскохозяйственных кормов и фармацевтических препаратов делает всё более актуальным вопрос разработки эффективных методов идентификации трансгенной ДНК. Необходимость контроля диктует потребность в аналитических методах, способных обнаруживать присутствие генетически модифицированных ингредиентов (ГМИ) в продуктах питания. Наиболее эффективным методом для тестирования на наличие ГМИ является ПЦР (полимераза-цепная реакция) – анализ, позволяющий выявить рекомбинантную ДНК. Большинство трансгенных растений получено баллистическим методом путём встраивания в их геном генно-инженерной конструкции, содержащий промотор, специфическую вставку и терминатор. В соответствии с нормативами для доказательства присутствия ГМИ достаточно обнаружить один из рекомбинантных ДНК. Для анализа методом ПЦР необходимо минимальное количество образца, содержащую интактную ДНК, несущую целевой ген. Наиболее высокой специфичностью является метод на основе ДНК дающий точный результат детекции ГМО - это ПЦР в реальном времени. Метод ПЦР в реальном времени основан на измерении флюоресцентного сигнала в каждом цикле амплификации. Интенсивность сигнала пропорциональна концентрации конечного продукта ПЦР на момент измерения.

По этой причине нами был выбран именно этот подход для анализа образцов продуктов питания на наличие ГМО.

В работе использовано нижеперечисленное оборудование:

1. GeneAmp® ПЦР – Real Time PCR 7500
2. Высокоскоростная центрифуга для микропробирок
3. Микропробирки объемом 1,5 или 2,0 мл
4. Микропипетки "Varipipette" переменного объема на 1000,200 и 20 мкл и наконечники к ним
5. Штатив для пробирок 2,0 мл
6. Термостат типа блок "Терцик"
7. Встряхиватель типа «Vortex»
8. Весы электронные «DENVERINSTRUMENT» 200 G
9. Камера для горизонтального электрофореза "SE-2" Helicon
10. Система документирования результатов геля электрофореза - WiseDOC, модель-WGD 30 Gel documentation system WiseDOC model WGD-30
11. Микроволновая печь, M1712NR Samsung
12. Источник питания "Эльф-8"
13. Шпатели

2.2. Сбор материала

Исследования проводились в Центре медицинской генетики (ЦМГ) при Институте Биохимии (ИБХ) Академии Наук Республики Узбекистан (АН РУз).

2.3. Выделение ДНК

Материалом для ДНК служили пищевые продукты. Для сбора, хранения и транспортировки образцов использовались одноразовые пластиковые пробирки объемом 0,5 мл. Образцы для дальнейшей обработки хранились при температуре не менее +4 °С.

Выделение ДНК осуществлялось набором реактивов для выделения ДНК "Сорб-ГМО-А" (производство "ВНИИ СБ/СИНТОЛ", Москва, Россия).

Протокол выделение ДНК с использованием сухого набора реагентов Сорб-ГМО-А

Состав набора:

Реактив №2 – Лизирующий буфер, 40 мл

Реактив №3 – Протеиназа К, 0.9 мл

Реактив №4 – Буфер для сорбента, 10 мл

Реактив №5 – Сорбент, 1.1 мл

Реактив №6 – Промывочный раствор А, 15 мл

Реактив №7 – Промывочный раствор Б, 50 мл

Реактив №8 – ТЕ-буфер, 6 мл

1. Измельченные навески образцов перенесли в одноразовые микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл или 2.0 мл. Дополнительно в каждой серий выделений приготовили пустую пробирку для ОКО-В.

2. Внесли в каждую пробирку (включая (ОКО-В)) по 800 мкл Лизирующего буфера и 15 мкл Протеиназа К. Тщательно перемешали на вортексе или с помощью стеклянной палочки.
3. Инкубировали смесь 30 минут при температуре +60⁰С, периодически перемешивая на вортексе (каждые 5-10 минут). Остудили пробирки (1-2 минуты) и центрифугировали смесь 5 минут при 12-14 тыс. об/мин.
4. Во время лизиса и центрифугирования приготовили Осаждающий Реактив. Для этого в новую пробирку на 1.5 мл внесли 200 мкл Буфера для сорбента и 40 мкл Сорбента (Сорбент непосредственно перед внесением интенсивно перемешали на вортексе до полной гомогенизации).
5. Верхнюю водную фазу из пробирок с образцами в объеме 300 мкл очень аккуратно, не захватывая нижний слой и не осевшие частицы, перенесли отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами в пробирки с Осаждающим Реактивом.
6. Интенсивно перемешали пробирки на вортексе до полного ресуспензирования сорбента. Инкубировали при комнатной температуре 10 минут, периодически встряхивая пробирку. Центрифугировали суспензию при 7 тыс. об/мин 1 минуту. Удалили супернатант, используя отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Добавили к осадку 300 мкл Промывочный раствор А. Интенсивно перемешали на вортексе до полного ресуспензирования сорбента. Центрифугировали суспензию при 7 тыс. об/мин 30 секунд. Удалили супернатант, используя отдельный наконечник для каждой пробы.
8. В флакон с Промывочным раствором Б добавили 40,5 мл 95-96% этилового спирта и перемешали.
9. Добавили к осадку 500 мкл Промывочный раствор Б. Интенсивно перемешали на вортексе до полного ресуспензирования сорбента.

Центрифугировали суспензию при 7 тыс. об/мин 30 секунд. Удалили супернатант, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

10. Добавили к осадку еще 500 мкл Промывочный раствор Б. Интенсивно перемешали на вортексе до полного ресуспензирования сорбента. Центрифугировали суспензию при 7 тыс. об/мин 30 секунд. Максимально удалили супернатант, используя отдельный наконечник для каждой пробы.
11. Поместили пробирки с открытыми крышками в термостат на 60⁰С на 10- 15 минут до полного испарения жидкости (сорбент стал белым).
12. К сухому осадку добавили 100 мкл ТЕ-буфера, перемешали на вортексе. Инкубировали 5 минут при температуре +60⁰С, перемешивая каждые 2 минуты. Центрифугировали суспензию при 12-14 тыс. об/мин 2 минуты. Чистую над осадочную жидкость (около 70 мкл) отобрали, не захватывая сорбент, в новую пробирку объемом 0.5 или 1.5 мл.

2.4. Проведение Электрофореза

1. Приготовили рабочего раствора буфера для электрофореза (0,5хТВЕ). В мерную колбу (цилиндр) на 1000 мл внесли 50 мл приготовленного 10хТВЕ буфера, довели до метки дистиллированной водой и перемешали до полного растворения. ТВЕ буфер использовали также и для приготовления агарозного геля.
2. Приготовление агарозного геля. Взвесили 0,9 гр агарозы. В коническую колбу на 500 мл внесли 0,9 гр агарозы, добавили 100 мл готового 0,5хТВЕ буфера и поместили в микроволновую печь. Довели содержимое колбы до кипения и после того, как агароза полностью расплавилась, колбу с агарозой сняли с плитки. Готовая агароза была прозрачной и не содержал нерасплавленных частиц.

3. Подготовка электрофоретической камеры к заливке агарозного геля.
Установили крышку с ванночкой на камеру, а платформу для заливки геля поместили в ванночку. Установили гребенку на платформу.
4. Расплавленную агарозу охладили приблизительно до 50⁰С на столе при комнатной температуре. Затем в колбу с готовой агарозой внесли 7мкл этидиума бромиды и осторожно перемешали содержимое колбы равномерными вращательными движениями.
5. Агарозу налили на платформу. Толщина слоя агарозы была около 4 мм.
6. После застывания агарозы (примерно через 20-25 мин) осторожно, не порвав карманы, вынули гребенку, а платформу с застывшим агарозным гелем перенесли из ванночки в электрофоретическую камеру.
7. Добавили 0,5x TBE буфер в электрофоретическую камеру так, чтобы буфер покрывал агарозный гель слоем приблизительно 2-3 мм.
8. Отобрали необходимое количество исследуемого образца и от 3 - до 10 мкл красителя для нанесения проб в гель – ксиленцианол. Тщательно перемешали краситель и образец, затем нанесли весь объем в соответствующую лунку агарозного геля, осторожно, чтобы предотвратить перетекание из одного кармана в другой.
9. Установили крышку на камеру, подключили электрофоретическую камеру к источнику питания и установили на источнике питания напряжение 100-120 В.
10. Через 20 - 30 мин электрофоретическую камеру отключили от источника питания, отсоединили провода от камеры, сняли крышку с электрофоретической камеры.
11. Вынули платформу с агарозным гелем из электрофоретической камеры, дали жидкости стечь с геля и осторожно промыли агарозный гель водой.
12. Осторожно перенесли гель на экран УФ трансиллюминатора.
13. Зафиксировали полученное изображение, сохранили данные, а затем проанализировали результаты.

2.5. Проведение ПЦР-амплификации в режиме реального времени.

Отсутствие продуктов амплификации в положительном контрольном образце говорит о неправильности прохождения ПЦР. Причиной тому может служить истечение сроков эксплуатации набора, неправильность его применения и хранения.

При постановке ПЦР необходимо ставить и отрицательный контроль во избежание ложного результата, причиной которого может стать контаминация составляющих реакции.

Во избежание контаминации следует соблюдать следующие правила:

- Работать с одноразовыми пробирками и наконечниками с фильтрами
- При отборе реактивов и образцов использовать отдельные наконечники
- Перед открытием пробирки с реактивом или раствором ДНК пробирку следует центрифугировать на микроцентрифуге Vortex в течении нескольких секунд
- Использовать одноразовые перчатки при каждом проведении ПЦР.

Были использованы следующие последовательности праймеров.

Праймеры для идентификации промотора 35S:

1 - GCT CCT ACA AAT GCC ATC A

2 - GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA

Праймеры для идентификации терминатора NOS:

1 - GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG

2 - GA TCC TAG TTT GCG CGC TA

Проведение ПЦР-амплификации осуществлялось с помощью Комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК «СКАН-СОЯ», «СКАН-

КУКУРУЗА», «ФЛАНК-ГЕН» (производство "ДНК-технология", Москва, Россия).

Протокол проведения ПЦР-амплификации с использованием набора реагентов «СКАН-СОЯ», «СКАН-КУКУРУЗА», «ФЛАНК-ГЕН»

Состав набора:

▪ Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	50 пробирок
▪ Раствор Taq-полимеразы	500 мкл	1 пробирка
▪ ПЦР-буфер (фон)*	200 мкл	1 пробирка
▪ Минеральное масло	1,0 мл	1 пробирка
▪ Положительный контрольный образец (К+)	150 мкл	1 пробирка

Протокол проведения ПЦР.

1. Промаркировали пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации (с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца – «К-», положительного контрольного образца - «К+»).
2. Добавили в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы.
3. Добавили в каждую пробирку по 1 капле минерального масла (около 10 мкл).
4. Перенесли пробирки в зону пробоподготовки.
5. Добавили в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»). В пробирку,

маркированную «К-», внесли 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку, в пробирку, маркированную «К+», внесли 5,0 мкл положительного контрольного образца.

6. Центрифугировали пробирки при 1000 об/мин в течение 3-5 с.

7. Установили все пробирки в амплификатор и проводили ПЦР в режиме, приведенном в таблице 1, с учетом объема реакционной смеси 35 мкл.

Стадии	Температура	Время	Количество циклов
Денатурация	80°C	30 с	1
	94°C	1 мин 30 с	
Амплификация	94 °C	30 с	5
	64 °C	45 с	
Амплификация и считывание результатов	94 °C	10 с	45
	64 °C	45 с	
Хранение	10 °C	Неограниченное	

Таблица 1. Программа для проведения ПЦР-амплификации в режиме реального времени.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

3.1 Обоснование полученных результатов

Разработка эффективных, точных и надежных методов определения наличия ГМО в продуктах питания, является одной из самых важных задач современной биотехнологии.

Употребление в пищу продуктов, содержащих ГМО не безопасно для здоровья людей. Так, в 2002 г. в США и в скандинавских странах был проведен сравнительный анализ частоты заболеваний, связанных с качеством продуктов питания. Население сравниваемых стран имеет достаточно высокий уровень жизни, близкую продуктовую корзину, сопоставимые медицинские услуги. Оказалось, что за несколько лет после широкого выхода ГМО на рынок в США было зафиксировано в 3–5 раз больше пищевых заболеваний, чем, в частности, в Швеции. Единственным существенным отличием в качестве питания является активное употребление в пищу ГМ-продуктов населением США и их практическое отсутствие в рационе шведов.

Поэтому определение содержания ГМ составляющих в пищевых продуктах, импортируемых в Узбекистан из за рубежа является актуальной задачей для сохранения здоровья населения нашей страны. В связи с этим в задачу данных исследований входило качественное определение искомым видоспецифичных генов методом ПЦР-анализа в реальном времени (PCR-Real Time).

3.2 Сухой суповой набор

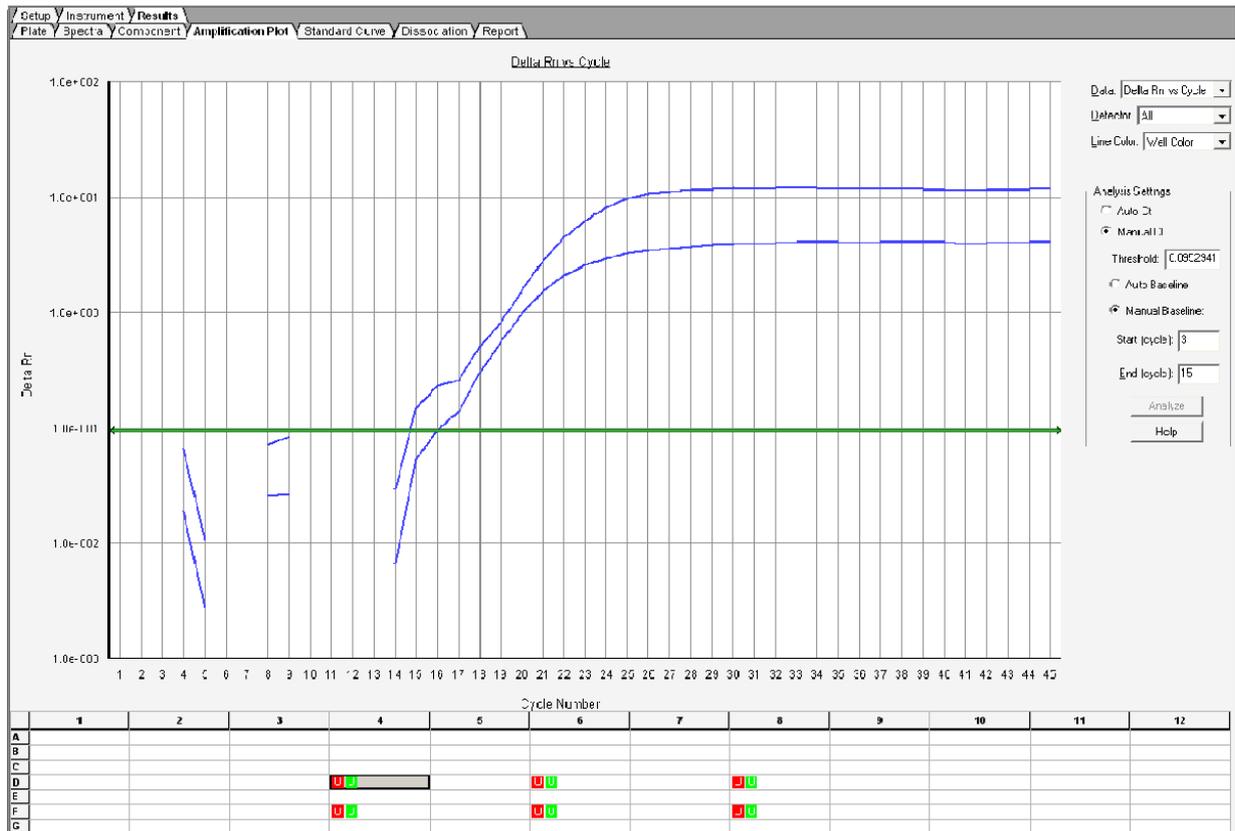


Рисунок 1. Исследуемый образец - сухой овощной суп.

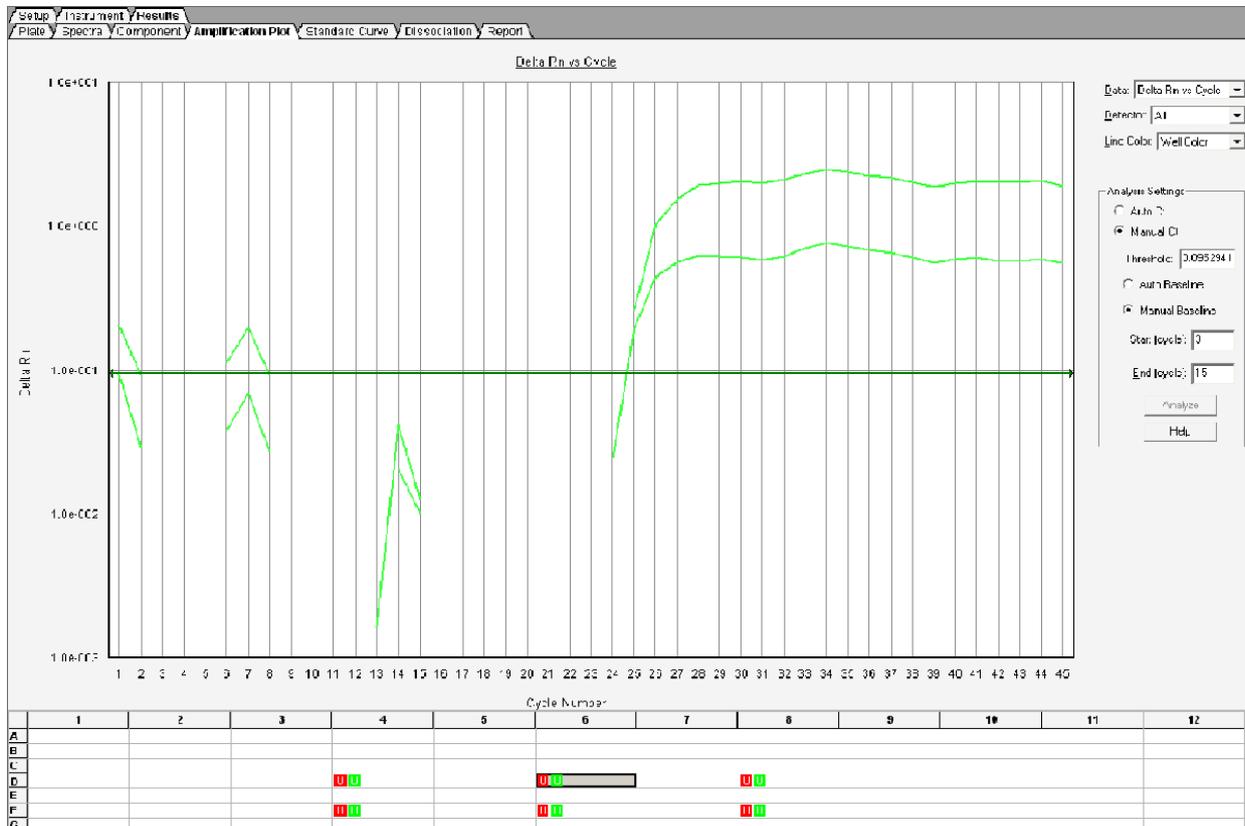


Рисунок 2. Положительный контрольный образец набора "Скан -соя".

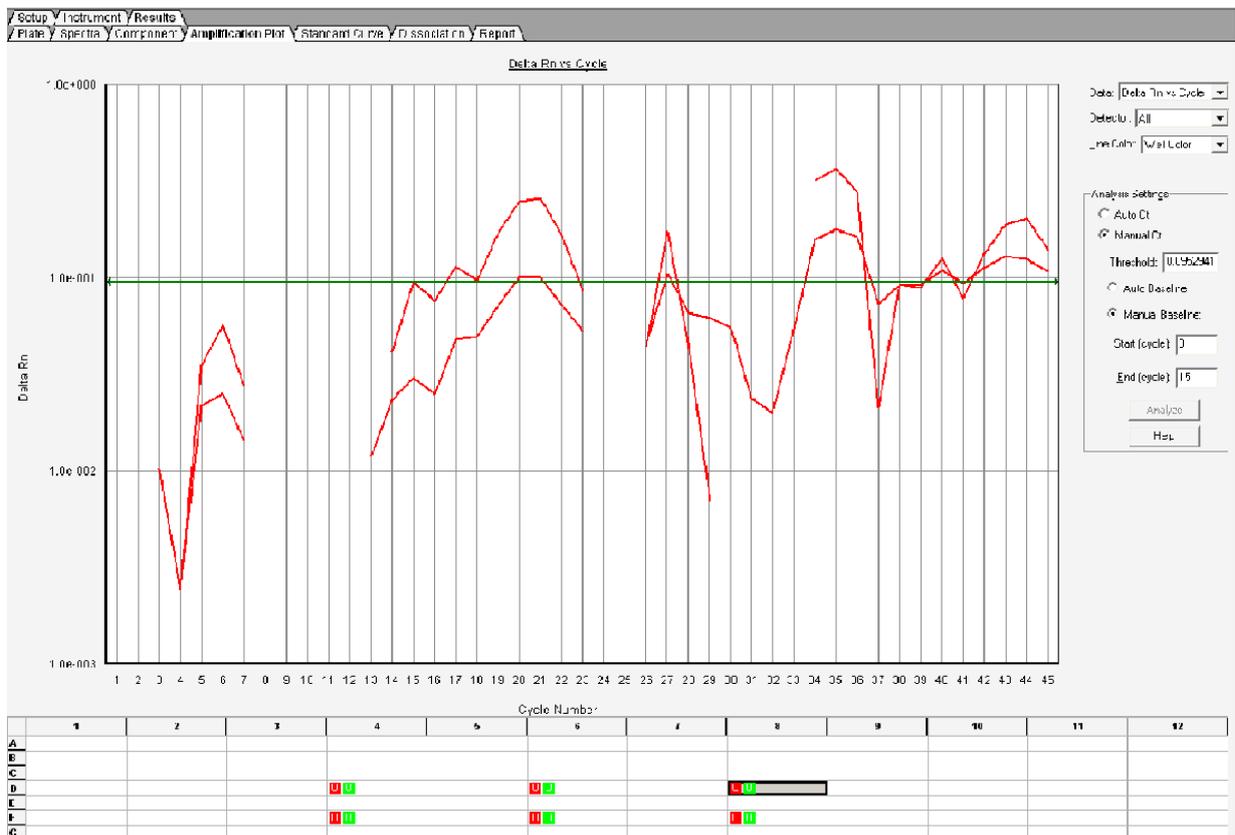


Рисунок 3. Отрицательный контрольный образец набора "Скан -соя"

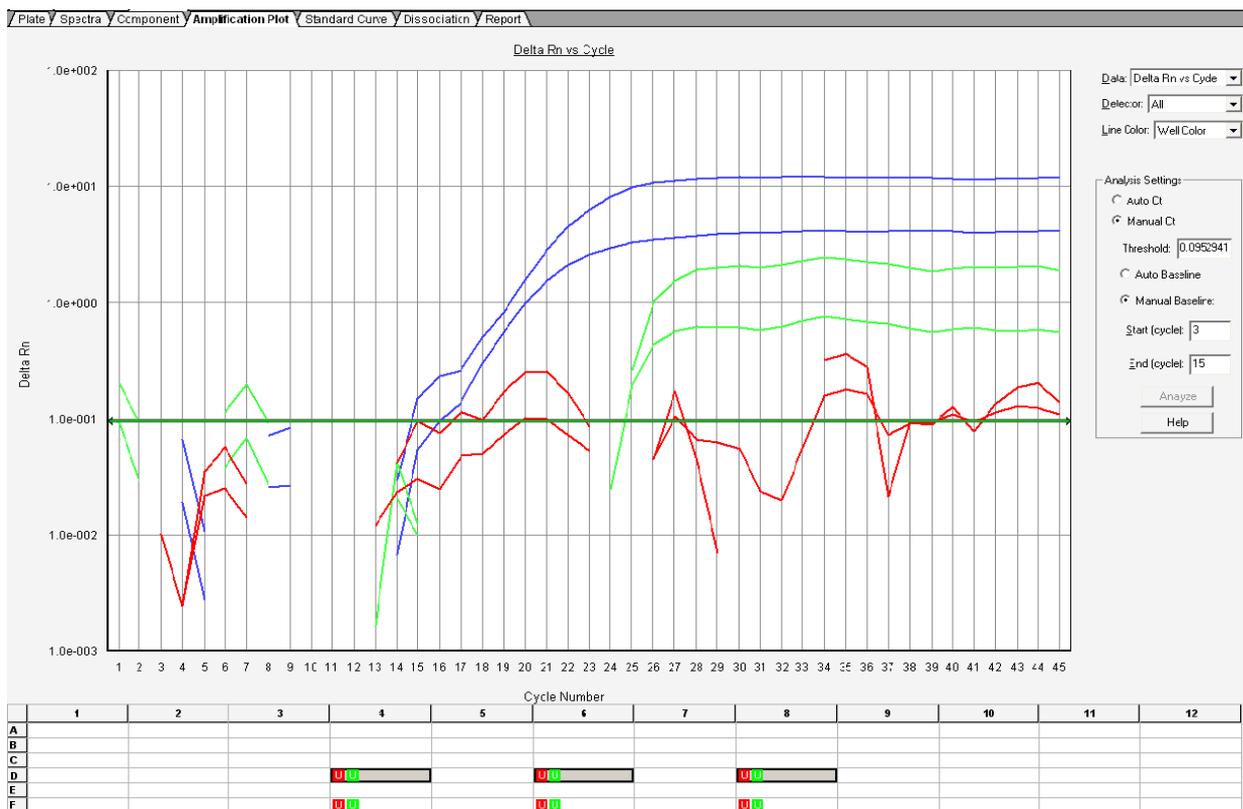


Рисунок 4. Результат проведения ПЦР-амплификации в режиме реального времени с набором "Скан -соя".

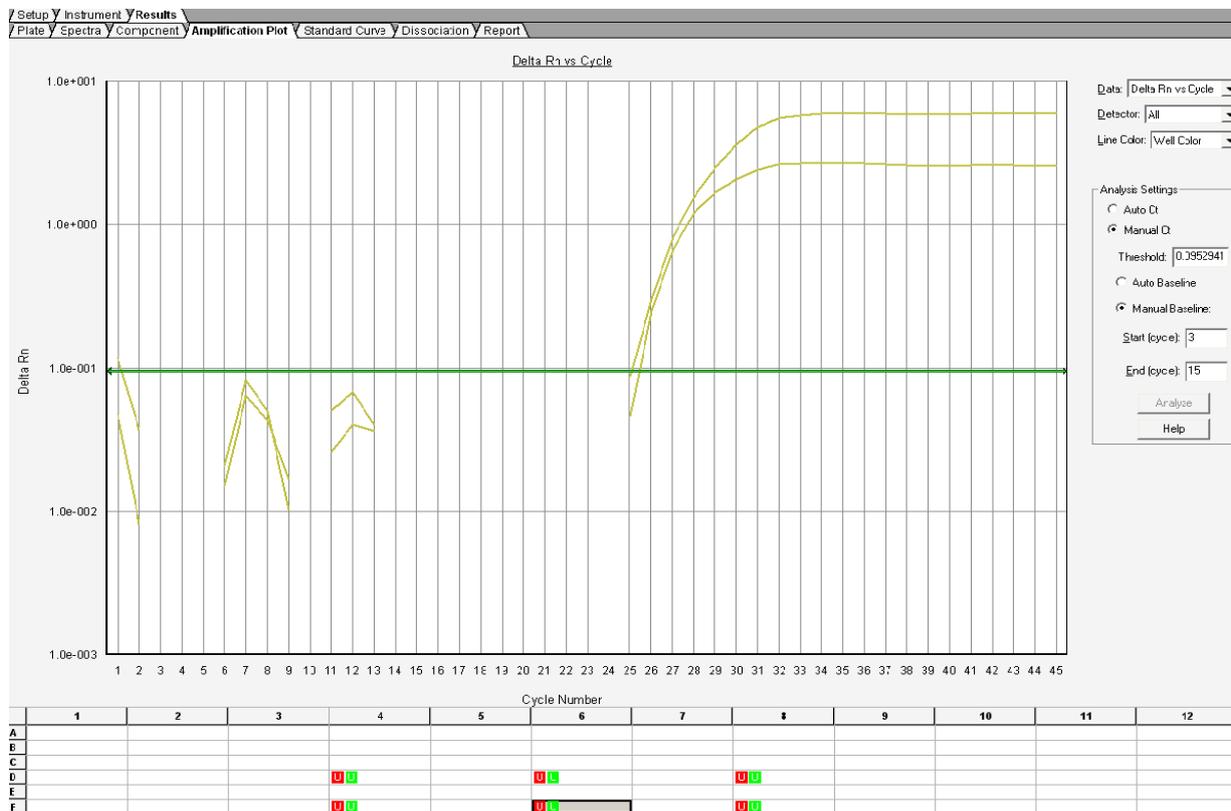


Рисунок 5. Исследуемый образец - сухой овощной суп "Скан-кукуруза".

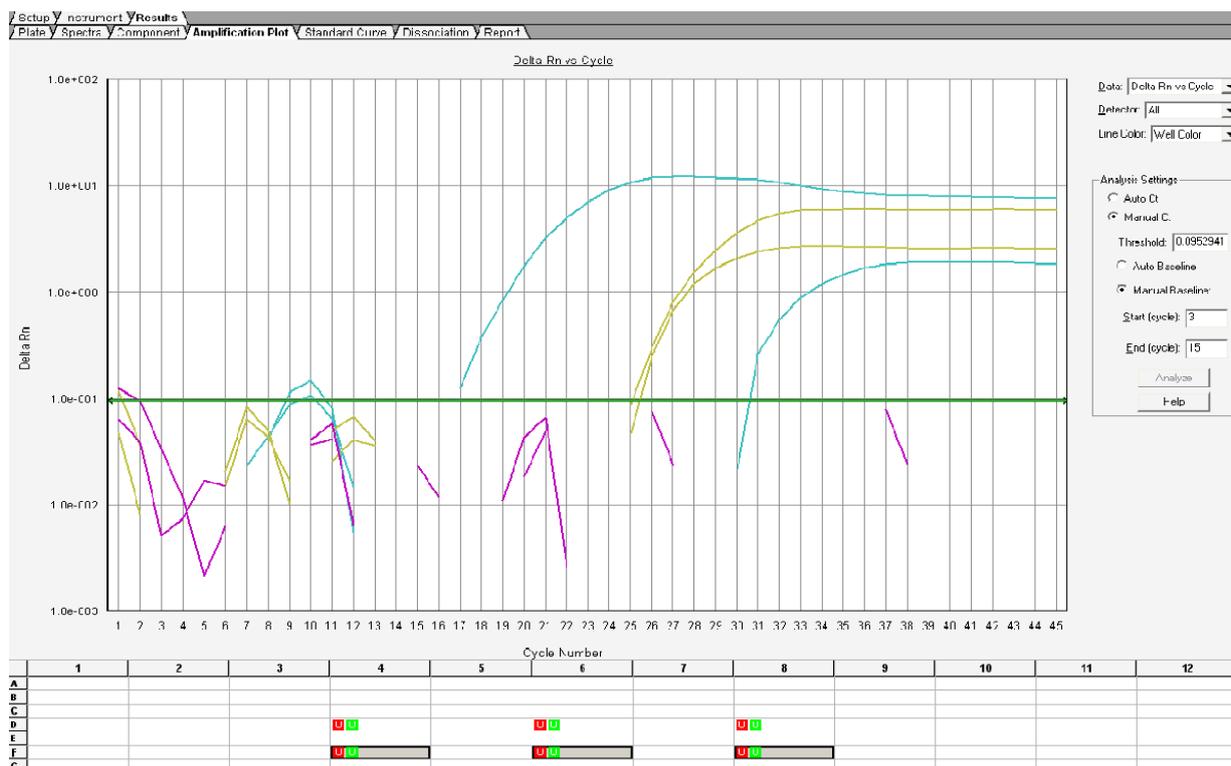


Рисунок 6. Результат проведения ПЦР-амплификации в режиме реального времени с набора "Скан-кукуруза".

3.2.1 Обсуждение результатов

Сухой суповой набор, поставленный в виде гуманитарной помощи из США был исследован на содержание ГМ. Ввиду того, что часто в сухие суповые наборы в качестве компонент входят соя и кукуруза, данный продукт был исследован на содержание этих составляющих. И действительно результаты скрининга свидетельствовали о наличии ГМ-сои и ГМ-кукурузы. Таким образом, импортный сухой суповой набор представляет собой ГМ продукт.

3.3 Бутылочный чай с различными ингредиентами

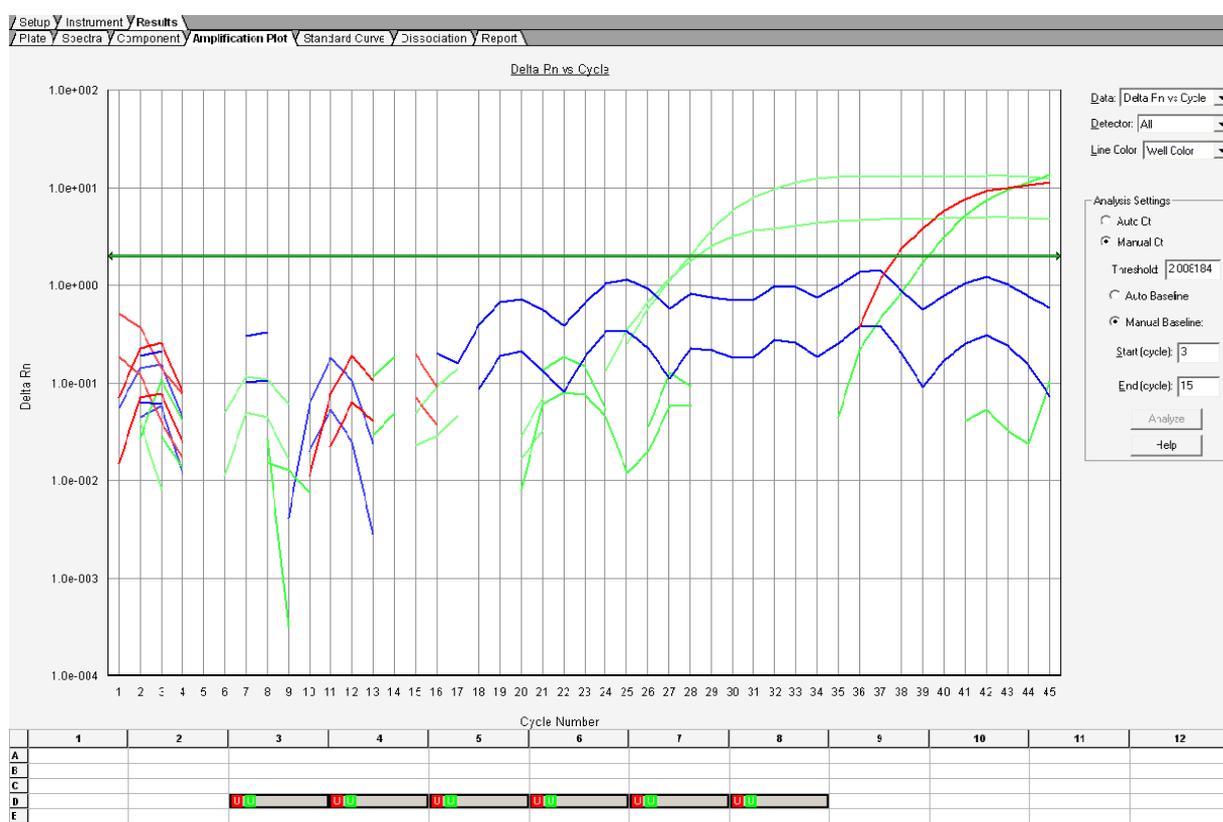


Рисунок 7. Результат проведения ПЦР-амплификации в режиме реального времени.

3.3.1 Обсуждение результатов

С целью скрининга отечественных пищевых продуктов на содержание ГМ-ингредиентов был выбран холодный бутылочный чай, имеющий различные вкусовые оттенки и поставляемый на продажу через коммерческую сеть нашей республики. Различные вкусовые оттенки

исследуемого чая появлялись вследствие добавления в него персика, лимона, малины и абрикоса. Все тестированные вариации чая показали отсутствия в нём ГМ-добавок. Таким образом, производимые в республике холодный бутылочный чай, а значит и ингредиенты в форме местных фруктов, используемые при приготовлении данного напитка, не являются ГМ-продуктом и может быть рекомендован как безопасный пищевой продукт.

ВЫВОДЫ

1. Освоена методика определения генно-модифицированных организмов в пищевых продуктах с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени.
2. Показано, что сухой суповой набор, поставленный в виде гуманитарной помощи из США, представляет собой ГМ-пищевой продукт.
3. Выявлено, что отечественный холодный бутылочный чай, поставляемый на продажу через коммерческую сеть нашей республики, не является ГМ-пищевым продуктом.
4. Полученные нами результаты по исследованию импортного сухого супового набора подтверждают данные, описанные в публикациях зарубежных исследователей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Учебник. М.: ГЭОТАР-мед., 2002.
2. Emery A. E. H. Muscular Duchenne dystrophy. Oxford monographs on medical genetics. Oxford : Univ. press, 1987. Vol. 15. 338 p.
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. – М.: Мир, 2002.
4. Higuchi R., Bollinger G., Walsh P. S., Griffith A Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences // Biotechnology. 1992
5. Higuchi, Fockler, C., Bollinger, G., Д. Kinetic PGR: Real time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993
6. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G. Studies on polynucleotides. XCVL Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases // J Mol Biol. 1971
7. Scharf S., Faloon F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Science. 1985
8. Birch D. IS. Simplified hot start PCR // Nature, 1996
9. Chou Q., Russell M., Birch D., Raymond J., Bloch W. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy- number amplifications//Nucleic Acids Res., 1992
10. Dang C, Jayasena S. D. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR // J Mol Biol., 1996
11. Ребриков Д.В., Саматов Д.В., Трофимов Д.Ю. и др. - ПЦР в реальном времени – 2009
12. Информация с веб-сайта <http://harvardscience.harvard.edu/foundations/articles/stem-cells-used-treat-muscular-dystrophy-mice>