

УДК 613.26

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Мухаммадиева Г.Ф., Каримов Д.О., Кутлина Т.Г., Валова Я.В.

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

Цель обзорной статьи — проанализировать существующие методы определения наличия генно-инженерно-модифицированных организмов в пищевых продуктах. Все методы для определения генно-инженерно-модифицированных организмов основаны на анализе дезоксирибонуклеиновой кислоты и белков. Методы анализа дезоксирибонуклеиновой кислоты являются более распространенными в лабораторной практике, по сравнению с анализом белков генно-инженерно-модифицированных организмов. К методам анализа содержания дезоксирибонуклеиновой кислоты трансгенов в пищевых продуктах относятся различные варианты полимеразной цепной реакции, капиллярный гель-электрофорез, петлевая изотермическая амплификация, микрочипы, секвенирование следующего поколения. Для анализа белка потенциальных генно-инженерно-модифицированных организмов применяют иммуноферментный анализ. В статье кратко объясняются принципы методов анализа дезоксирибонуклеиновой кислоты и белков генно-инженерно-модифицированных организмов.

Ключевые слова: ГМО, полимеразная цепная реакция, капиллярный гель-электрофорез, изотермическая амплификация, микрочип, секвенирование следующего поколения, иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Мухаммадиева Г.Ф., Каримов Д.О., Кутлина Т.Г., Валова Я.В. Современные методы определения генно-инженерно-модифицированных организмов в пищевых продуктах. Медицина труда и экология человека. 2019; 2:101-111

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10029>

THE MODERN METHODS FOR THE DETERMINATION OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS IN FOOD PRODUCTS

Kudoyarov E.R., Muhammadieva G.F., Kutlina T.G., Valova Y.V., Karimov D.O., Karimov D.D.

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russia

The purpose of the review article is to analyze existing methods for determining the presence of genetically modified organisms in food products. All methods for determining genetically modified organisms are based on the analysis of deoxyribonucleic acid and proteins. Methods of analysis of deoxyribonucleic acid are more common in laboratory practice, compared with the analysis of proteins of genetically modified organisms. Methods for analyzing the content of deoxyribonucleic acid in food products include various variants of the polymerase chain reaction, capillary gel electrophoresis, loop-mediated isothermal amplification, microchips, the next generation sequencing. The enzyme-linked immunosorbent assay is used to analyze the protein of potential genetically modified organisms. The article briefly explains the principles of methods for the analysis of deoxyribonucleic acid and protein of genetically modified organisms.

Key words: GMO, polymerase chain reaction, capillary gel electrophoresis, loop-mediated isothermal amplification, microchip, next generation sequencing, enzyme-linked immunosorbent assay.

For quotation: Kudoyarov E.R., Muhammadieva G.F., Kutlina T.G., Valova Y.V., Karimov D.O., Karimov D.D. *The modern methods for the determination of genetically modified organisms in food products. Occupational health and human ecology.* 2019;2:101-111.

DOI: <http://dx.doi.org/1024411/2411-3794-2019-10029>

С появлением методов генной инженерии и молекулярной биологии стало возможным изменять геном организмов посредством трансформации. Как правило, эти изменения включают в себя введение набора генов (трансгенной кассеты) в геном организма. Обычно трансгенные кассеты состоят из многих генов, чужеродных для хозяина, но содержат желаемый ген с сильным промотором и регуляторами экспрессии [1]. Экспрессия гена проходит в 2 стадии. На первой происходит транскрипция гена с образованием матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК). На втором этапе мРНК транслируется на рибосоме и синтезируется белок из аминокислот.

В Российской Федерации с 2017 года существует Сводный государственный реестр генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО), а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы, включая указанную продукцию, ввозимую на территорию Российской Федерации. В этот реестр вносятся данные о ГМО и модифицированной продукции, предоставленные Министерством здравоохранения РФ, Росздравнадзором, Роспотребнадзором и Россельхознадзором. Основным регламентирующим документом, в котором показано максимально допустимое количество ГМО в пищевых продуктах (0,9%), является *Технический Регламент Таможенного Союза «О безопасности пищевой продукции»* [2]. Кроме того, к продукции, содержащей ГМО, применяются требования ТР ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки» [3].

Согласно информации из базы данных Statista, площадь посевов ГМ-растений с 2003 по 2017 гг. выросла с 67,7 до 189,8 млн га. Лидерами по площади посевов остаются США (около 70%), Бразилия и Аргентина. Однако в США производится 2/3 мировой продукции, содержащей ГМ-растения или их компоненты [4]. Таким образом, существуют предпосылки поступления продукции, изготовленной из ГМО или их компонентов, на места их коммерческой реализации в Российской Федерации, что объясняет необходимость контроля надзорными органами за выполнением требований нормативных документов производителями пищевых продуктов.

В странах Евросоюза производитель обязан заявлять об уровне ГМО в составе готовой продукции при превышении порога содержания в продуктах питания (0,9%) [5]. При оформлении разрешения использования или истечении срока действия ранее выданного разрешения на корма для животных установлен порог содержания ГМО в готовом продукте на уровне 0,1% [6]. Поэтому в европейских странах, где продают товары, содержащие в составе ГМО, повышается потребность в высокоточном количественном определении присутствия трансгенов не только в пищевой продукции, но и в других коммерчески реализуемых продуктах (лекарственные средства, ветеринарные препараты, корма для животных, одежда и т.п.).

К настоящему времени в Российской Федерации разработаны и внедрены методические указания для идентификации ГМО растительного происхождения [7-14]. Однако разработка новых методов для идентификации и количественного контроля ГМ организмов в России и мире продолжается до сих пор [15, 16]. По этой причине информация о разрабатываемых в мире методах поиска новых ГМО и определении уже зарегистрированных в РФ будет способствовать разработке нормативно-правовой базы и методического обеспечения лабораторий, осуществляющих проведение соответствующих испытаний пищевых продуктов.

Классификация методов для определения ГМО

Существует 2 группы методов обнаружения ГМО: основанные на анализе ДНК и использующие для анализа белки. К настоящему времени методы идентификации, основанные на лабораторном анализе ДНК, являются значительно распространенными, по сравнению с методами идентификации белков в ГМ-организмах. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени по-прежнему занимает лидирующую позицию при выявлении присутствия ГМО. ПЦР применяли для обнаружения модификаций генов как в сырых, так и обработанных продуктах, но кроме нее разрабатываются и такие способы обнаружения ГМО, как микрочипы, электрофорез в капиллярном геле (КГЭ), петлевая изотермическая амплификация, цифровая ПЦР и секвенирование следующего поколения [17]. Общей начальной стадией для любого метода идентификации ГМО является пробоподготовка, направленная на экстракцию соответствующей фракции биоматериала (дезоксирибонуклеиновая кислота или белок) и включающая специальную предобработку (очистка от примесей, определение концентрации, оценка степени разрушения при экстракции, разведение, мечение).

Методы идентификации ГМО по ДНК, содержащейся в пробе

1. Группа методов идентификации ГМО, основанные на принципах полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Технологии идентификации ГМО на основе ПЦР состоят из четырех групп: методы скрининга, методы для определения трансгена, для определения трансгенной конструкции и специфические методы для определения трансгенных событий [18]. Скрининг ГМО включает в себя обнаружение регуляторных элементов, в первую очередь связанных с ГМО (то есть последовательностей промотора и терминатора) [19, 20]. Метод определения трансгена в геноме идентифицирует конкретный ген, например *epsps* (устойчивость к гербицидам) или *cry9c* (устойчивость к насекомым), в то время как конструктивно-специфический метод направлен на определение конструкции трансгена, состоящего из промотора и генов [21]. Различные исследования также показали, что различные целевые гены (*ctp2-cry2Ab2*, *ctp2-cr4epsps*, *p35S-cry1Ac*, *p35S-uidA*) могут быть обнаружены методами специфичными к определенным генетическим конструкциям [22, 23]. Технология обнаружения с помощью полимеразной цепной реакции, специфичной для конкретного случая, обычно используется для определения ГМО благодаря своей способности специально выявлять определенное трансгенное событие путем нацеливания на их уникальное соединение между геномом хозяина и трансгенной кассетой [24].

К настоящему времени получают распространение наборы для проведения мультиплексных количественных ПЦР, позволяющие определять множество типов ГМ-культур в единой реакционной смеси [25, 26]. Несмотря на это, учеными были предприняты усилия для разработки альтернативных методов идентификации ГМО в лабораторных и полевых условиях.

2. Цифровая ПЦР (цПЦР).

Цифровая ПЦР является технологией, позволяющей преодолеть проблемы, возникающие при проведении количественной ПЦР, особенно присутствие ингибиторов ПЦР или малое количество копий трансгенной ДНК. Это один из самых надежных методов среди используемых в настоящее время технологий для количественной оценки ГМО. При проведении цифровой ПЦР пробу размещают в большом количестве изолированных микролунок-реакторов. При этом состав ПЦР-смеси для проведения реакции используется тот же самый, что и для количественной ПЦР (буферный раствор, полимеразы, праймеры, флуоресцентные зонды или краситель). После термоциклирования всего набора микролунок-реакторов производится детекция флуоресцентного сигнала с помощью специального спектрофотометра, т.н. ридера.

В обзорной статье Demeke и Dobnik [27] обсуждается использование цифровой ПЦР для идентификации и количественного описания ГМО и выбор оптимальных параметров для получения точных результатов. Этот обзор авторы рекомендуют рассматривать в качестве универсального руководства для лабораторий, собирающихся применять цПЦР.

3. Капиллярный гель-электрофорез.

Одними из первых, кто предложил простой и качественный девятикомпонентный метод ПЦР для одновременного обнаружения в одной пробирке генно-инженерно-модифицированных сортов кукурузы T25, GA21, TC1507, MON863, MON810, NK603, генетических конструкций VT176 и VT11 и гена домашнего хозяйства кукурузы *hmgA*, являются ученые из Норвежского НИИ пищевых исследований [28]. ПЦР проводят с праймерами, мечеными флуоресцентными красителями. Новшеством является то, что ампликоны разделяют по длине и окраске с помощью капиллярного электрофореза в геле (КГЭ). Предел обнаружения составил до 0,1% для каждого вида ГМО. Представленный метод подходит для скрининга пищевых продуктов и кормов, содержащих наиболее распространенные ГМО [28].

Главным отличием капиллярного гель-электрофореза является более высокая разрешающая способность при разделении ампликонов, по сравнению с тонкослойным гель-электрофорезом [29]. К настоящему времени уже разработаны различные варианты праймеров для мультиплексной ПЦР для обнаружения 3 и более сортов ГМ хлопка, сои, кукурузы [30-32]. Однако вышеупомянутый способ имеет некоторые недостатки, так как требует кропотливого труда при разработке праймеров и оптимизации условий анализа. Для его реализации также требуются специализированные устройства, которые могут не всегда быть доступны. Поскольку эта методика обычно не используется для количественного определения трансгенных событий, то существует потребность в ее аутентификации и валидации [17, 33].

4. Петлевая изотермическая амплификация.

Петлевая изотермическая амплификация (ПИА) является относительно новой технологией, которая была применена недавно для обнаружения переноса чужеродных генов [34, 35]. К настоящему времени разработана техника для идентификации различных сортов ГМ риса [17, 36].

В ПИА предусматривается использование четырех различных праймеров, которые идентифицируют по меньшей мере шесть различных сегментов нужной ДНК. Реакция инициируется одной из пар праймеров, имеющих как одинаковые, так и противоположные последовательности желаемой области ДНК. Реакция проходит при постоянной температуре 60-65°С, а затем еще одна пара праймеров участвует в образовании петли [33]. Продукт изотермической амплификации идентифицируют по «лестничному» рисунку распределения ДНК после электрофореза в агарозном геле, реже за амплификацией продукта наблюдают «в реальном времени» либо путем использования турбидиметрии [37]. Также можно оценить образование продуктов амплификации в конце реакции ПИА посредством использования интеркалирующих флуоресцентных красителей [34].

ПИА относительно простой и эффективный вариант ПЦР, не требующий дорогостоящего оборудования. Для проведения реакции достаточно водяной бани с нагревательным блоком, но и у этого метода есть свои ограничения. Первое из них связано с трудностью подбора праймеров, связанной с необходимостью сочетания их специфичности к выбранному участку гена и малой вероятности образования димеров между собой. Вторым является трудность расшифровки результатов анализа при малом количестве продукта. Недостаток продукта амплификации подтолкнул ряд китайских авторов к разработке турбидиметра, специально предназначенного для детекции ампликонов «в реальном времени» [38]. Кроме того, существуют огромные трудности при разработке мультиплексной ПЦР по технологии петлевой изотермической амплификации.

5. Микрочиповая технология.

Микрочипы (ДНК-чипы) — это технология высокопроизводительного обнаружения ГМО. При использовании микрочипа происходит параллельное обнаружение большого количества генетических элементов из сложных образцов ДНК в одном анализе. Миниатюрность, высокая чувствительность и производительность являются основными преимуществами этой технологии [39]. Основная идея состоит в том, что множество специально разработанных зондов к ГМО и зонды, дублирующие последовательность ДНК в пробе, размещены на твердой поверхности малыми областями в виде точек в рядах, пересекающихся под прямым углом. Выделенную из пробы ДНК гибридизуют с массивом зондов, затем метят флуоресцентным красителем. На стадии гибридизации отмеченный сегмент ДНК остается связанным с зондами на основе принципа комплементарности. Чем больше длина комплементарных последовательностей ДНК, тем более прочной будет связь. После гибридизации последовательности, не связавшиеся с зондами, удаляются, затем измеряется интенсивность флуоресценции каждой точки поверхности с иммобилизованными комплексами ДНК-зонд [21]. Рядом авторов ранее были разработаны мультиплексные ПЦР на микрочипе для определения наличия в пробе сортов ГМ сои и кукурузы [40].

6. Секвенирование следующего поколения.

Секвенирование следующего поколения (ССП) является одним из наиболее новых методов, разрабатываемых для идентификации ГМ организмов. Эта технология позволяет проводить параллельную массовую расшифровку последовательности участка ДНК [1]. ССП — это эффективный инструмент для выявления трансгенных организмов при отсутствии какой-либо информации о чужеродных генах в ГМ организме [21], для определения места вставки гена, участков ДНК пограничных с геном, а также количества копий вставленного гена [17].

Существует два основных типа ССП: секвенирование отдельной области и секвенирование полного генома [1]. Секвенирование отдельной области может быть достигнуто при наличии информации о месте вставки чужеродного гена, что значительно экономит время и снижает стоимость анализа одной пробы. Но бывают случаи, когда неизвестно место вставки гена и необходимо определить последовательность ДНК во всем геноме. В этом случае создается ДНК-библиотека, содержащая информацию о вставленном гене. С помощью методов биоинформатики возможно сопоставить полученные данные с информацией из баз данных о геноме исследуемого вида и известных генных модификациях [41]. Полученная информация позволяет разработать новые праймеры для амплификации гена из неизвестного места вставки. К недостаткам этой технологии относится ее высокая стоимость и потребность в высококвалифицированных специалистах и оборудовании для проведения манипуляций и анализа данных. Однако, несмотря на методические трудности, ряд авторов предполагает, что в ближайшее время именно эта технология станет точным инструментом для поиска новых ГМ организмов [17].

Методы идентификации ГМО по содержанию белка, транслированного с мРНК трансгенов

Методами анализа белка потенциальных ГМО являются иммуноферментный анализ и применение экспресс-наборов для определения ГМО в потоке зерна [21]. Достоинствами последних является возможность их использования для качественного анализа наличия/отсутствия одного или множества модифицированных белков при минимальном обеспечении лабораторным оборудованием непосредственно на производстве. Для количественной оценки присутствия ГМ белка применяют иммуноферментный анализ (ИФА). В основе ИФА лежит специфическая реакция антиген-антитело. Ранее минимальное количество ГМ белка должно было составлять не менее 1% для получения достаточного сигнала для детекции [42]. В настоящее время уже есть коммерческие ИФА-наборы и тест-полоски для определения содержания ГМО с точностью до 0,1%.

Заключение.

Определение ГМО в пищевой продукции в мировом масштабе является развивающимся направлением молекулярно-генетической экспертизы более 25 лет, но наиболее значимые результаты приходится на 2010-е годы. После рассмотрения основных методов анализа пищевой продукции на содержание ГМО можно сделать вывод о том, что к настоящему времени для массового применения в лабораторной практике пригодны методы на основе ПЦР «в реальном времени». Однако для обеспечения высокой производительности необходимо разрабатывать наборы для мультиплексной ПЦР «в реальном времени», включающие маркеры новых сортов ГМ-растений [15, 16]. Отдельного внимания в качестве перспективного метода для выявления ГМО заслуживает цифровая ПЦР, позволяющая амплифицировать единичные копии трансгенной ДНК из всего пула нуклеиновых кислот, что недостижимо при проведении ПЦР «в реальном времени». Остальные методы определения ГМО, сопряженные с ПЦР (капиллярный гель-электрофорез, петлевая изотермическая амплификация, микрочиповая технология, ИФА), пока не получили широкого распространения по различным причинам (трудность оптимизации, высокая стоимость, недостаток квалифицированных сотрудников).

Не менее важной проблемой остается поиск маркеров новых ГМО, который предшествует разработке специфичных праймеров для амплификации трансгенных последовательностей. К настоящему времени самым производительным, но очень дорогим методом является секвенирование нового поколения. Секвенирование нового поколения позволяет определять последовательность как всего генома, так и отдельных его участков, где может находиться трансген. Однако, несмотря на его производительность, метод не получил широкого распространения из-за высокой стоимости оборудования и обработки данных. Для удовлетворения потребности исследователей в новых методах определения ГМО важно как совершенствование технических решений, так и способов обработки накапливаемой информации.

Список литературы:

1. Fraiture M.A., Herman P., De Loose M., Debode F., Roosens N.H. How can we better detect unauthorized gmos in food and feed chains? Trends Biotechnol [Internet]. 2017; 35(6):508–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28347568>.
2. ТР ТС 021/2011. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции». Утвержден решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 880.
3. ТР ТС 022/2011. Технический Регламент Таможенного союза «Пищевая продукция в части ее маркировки». Утвержден решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 881.
4. The Statistics Portal «Statista». URL: <https://www.statista.com/search/?q=GMO> (Дата обращения: 16.10.2018)
5. European Commission Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Off. J. Eur. Union L. 2003; 268:1–23.
6. European Commission Regulation (EC) No. 619/2011 of 24 June 2011 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed as regards presence of genetically modified material for which an authorization procedure is pending or the authorization of which has expired. Off. J. Eur. Union L. 2011; 166:9–15.
7. МУ 2.3.2.1917-04 «Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически модифицированные аналоги». – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора России; 2004.

8. МУ 2.3.2.3388-16 Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения с комбинированными признаками. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2016.
9. МУК 4.2.2008-05. «Методы идентификации генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения с применением ферментного анализа на биологическом микрочипе». – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2005.
10. МУК 4.2.3309-15 «Методы идентификации и количественного определения новых линий ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах». Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2015.
11. МУК 4.2.3389-16 «Валидация методов, предназначенных для выявления и идентификации генно-инженерно-модифицированных организмов в пищевых продуктах и продовольственном сырье: Методические указания». – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2016.
12. МУК 4.2.3390-16 «Детекция и идентификация ГМО растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции в матричном формате: Методические указания». – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2017.
13. Осуществление надзора за производством и оборотом пищевых продуктов, содержащих ГМО: Сборник методических указаний. Ч. 1. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
14. Осуществление надзора за производством и оборотом пищевых продуктов, содержащих ГМО: Сборник методических указаний. Ч. 2. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
15. Тышко Н.В. Контроль за генно-инженерно-модифицированными организмами растительного происхождения в пищевой продукции: научное обоснование и методическое обеспечение. *Вопр. питания* 2017; 86(5):29–33.
16. Тышко Н.В., Садыкова Э.О., Сухачева М.В., Батурин А.К. Молекулярно-генетические исследования генно-инженерно-модифицированного картофеля: трансформационное событие PH05-026-0048. *Вопр. питания* 2018; 87(4):25–31.
17. Milavec M., Dobnik D., Yang L., Zhang D., Gruden K., Zel J. GMO quantification: valuable experience and insights for the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; 406(26):6485–97.
18. Li P., Jia J., Jiang L., Zhu H., Bai L., Wang J., et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of the GMO carnation (*Dianthus caryophyllus*) variety Moonlite based upon the 5'-transgene integration sequence. *Genet. Mol. Res.* 2012; 11(2):1117–29.
19. Fu W., Zhu P., Wang C., Huang K., Du Z., Tian W., et al. A highly sensitive and specific method for the screening detection of genetically modified organisms based on digital PCR without pretreatment. *Sci. Rep.* 2015; 5:12715.
20. Xu J., Miao H., Wu H., Huang W., Tang R., Qiu M., et al. Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *Biosens. Bioelectron.* 2006; 22(1):71–7.
21. Salisu I.B., Shahid A.A., Yaqoob A., Ali Q., Bajwa K.S., Rao A.Q., et al. Molecular approaches for high throughput detection and quantification of genetically modified crops: a review. *Front Plant Sci.* 2017; 8:1670.
22. Chhabra R., Randhawa G.J., Bhoge R.K., Singh M. Qualitative and quantitative PCR-based detection methods for authorized genetically modified cotton events in India. *J. AOAC Int.* 2014; 97:1299–309.

23. Grohmann L., Brünen-Nieweler C., Nemeth A., Waiblinger H.-U. Collaborative trial validation studies of real-time PCR-based GMO screening methods for detection of the bar gene and the ctp2-cp4epsps construct. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(19):8913–20.
24. Zhang M., Yu Y., Gao X., Zhang K., Luan F., Zhu Y., et al. Event-specific quantitative detection of genetically modified wheat B72-8-11 based on the 3' flanking sequence. *Eur. Food Res. Technol.* 2015; 240(4):775–82.
25. Datukishvili N., Kutateladze T., Gabriadze I., Bitskinashvili K., Vishnepolsky B. New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in foods. *Front. Microbiol.* 2015; 6:757.
26. Peng C., Wang P., Xu X., Wang X., Wei W., Chen X., et al. Development of a qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms. *SpringerPlus.* 2016; 5(1):889.
27. Demeke T., Dobnik D. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification genetically modified organisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018; 410(17):4039-50.
28. Heide B.R., Heir E., Holck A. Detection of eight GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis. // *Eur. Food Res. Technol.* 2008; 227(2):527–35.
29. Dominguez Vega E., Marina M. L. Characterization and study of transgenic cultivars by capillary and microchip electrophoresis. *Int. J. Mol. Sci.* 2014. 15(12):23851–77.
30. Basak S., Ehtesham N.Z., Sesikeran B., Ghosh S. Detection and identification of transgenic elements by fluorescent-PCR-based capillary gel electrophoresis in genetically modified cotton and soybean. *J. AOAC Int.* 2014; 97:159–65.
31. Holck A.L., Pedersen B.O. Simple, sensitive, accurate multiplex quantitative competitive PCR with capillary electrophoresis detection for the determination of genetically modified maize. *Eur. Food Res. Technol.* 2011; 233:951–61.
32. Nadal A., Esteve T., Pla M. Multiplex polymerase chain reaction-capillary gel electrophoresis: a promising tool for GMO screening-assay for simultaneous detection of five genetically modified cotton events and species. *J. AOAC Int.* 2009; 92(3):765–72.
33. Fraiture M.-A., Herman P., Taverniers I., De Loose M., Deforce D., Roosens N.H. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015:392872.
34. Chen X., Wang X., Jin N., Zhou Y., Huang S., Miao Q., et al. Endpoint visual detection of three genetically modified rice events by loop-mediated isothermal amplification. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13:14421–33.
35. Li Q., Fang J., Liu X., Xi X., Li M., Gong Y., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of cry1Ab gene in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 2013; 236(4):589–98.
36. Zhou D., Guo J., Xu L., Gao S., Lin Q., Wu Q., et al. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Sci. Rep.* 2014; 4:4912.
37. Huang X., Chen L., Xu J., Ji H.-F., Zhu S., Chen H. Rapid visual detection of phytase gene in genetically modified maize using loop-mediated isothermal amplification method. *Food Chem.* 2014; 156:184–9.
38. Di H., Shi L., Shen H., Yan H., Meng H., Li L., et al. Rapid detection of genetically modified ingredients in soybean products by real-time loop-mediated isothermal amplification. *J. Food Nutr. Res.* 2014; 2(7):363–8.
39. Turkec A., Lucas S. J., Karacanli B., Baykut A., Yuksel H. Assessment of a direct hybridization microarray strategy for comprehensive monitoring of genetically modified organisms (GMOs). *Food Chem.* 2016; 194:399–409.

40. Xu X., Li Y., Zhao H., Wen S.Y., Wang S.Q., Huang J., et al. Rapid and reliable detection and identification of GM events using multiplex PCR coupled with oligonucleotide microarray. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53:3789–94.
41. Yang L., Wang C., Holst-Jensen A., Morisset D., Lin Y., Zhang D. Characterization of GM events by insert knowledge adapted resequencing approaches. *Sci. Rep.* 2013; 3:2839.
42. Stave J.W. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations, and practical considerations. *J. AOAC Int.* 2002; 85(3):780–6.

References:

1. Fraiture M.A., Herman P., De Loose M., Debode F., Roosens N.H. How can we better detect unauthorized gmos in food and feed chains? *Trends Biotechnol* [Internet]. 2017; 35(6):508–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28347568>.
2. TR CU 021/2011. Technical regulations of the Customs Union "Food safety". Approved by the Commission of the Customs Union decision of 9 December 2011 № . 880.
3. TR CU 022/2011. Technical Regulations of the Customs Union "Food products concerning its labeling". Approved by the Commission of the Customs Union decision of 9 December 2011 № . 881.
4. The Statistics Portal «Statista». URL: <https://www.statista.com/search/?q=GMO> (Accessed date: 16.10.2018)
5. European Commission Regulation (EC) № . 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Off. J. Eur. Union L.* 2003; 268:1–23.
6. European Commission Regulation (EC) No. 619/2011 of 24 June 2011 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed as regards presence of genetically modified material for which an authorization procedure is pending or the authorization of which has expired. *Off. J. Eur. Union L.* 2011; 166:9–15.
7. MG 2.3.2.1917-04 "The procedure and organization of control over food products obtained from / or using plant raw materials having genetically modified analogs". - M .: Russian Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision; 2004
8. MG 2.3.2.3388-16. Medical and biological safety assessment of genetically modified plant organisms with combined traits. M .: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2016
9. MI 4.2.2008-05. "Methods of identification of genetically modified plant organisms (GMO) using enzyme analysis on a biological microchip." - M .: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare; 2005.
10. MI 4.2.3309-15 "Methods of identification and quantification of new lines of GMOs of the 2nd generation in food products". Methodical instructions. - M .: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2015
11. MI 4.2.3389-16 "Validation of methods for detecting and identifying genetically modified organisms in food products and food raw materials: Guidelines". - M .: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2016
12. MI 4.2.3390-16 "Detection and identification of plant GMOs by the polymerase chain reaction method in a matrix format: Guidelines". - M .: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2017

13. Supervision of the production and circulation of food products containing GMOs: A compendium of guidelines. Part 1. - M: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотrebnadzor; 2008
14. Supervision of the production and circulation of food products containing GMOs: A compendium of guidelines. Part 2. - M: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотrebnadzor; 2008
15. Tyshko N.V. Control over genetically modified plant organisms in food products: scientific substantiation and methodological support. *Nutrition issues* 2017; 86 (5): 29–33.
16. Tyshko N.V., Sadykova E.O., Sukhacheva M.V., Baturin A.K. Molecular genetic studies of genetically modified potatoes: transformation event PH05-026-0048. *Nutrition issues* 2018; 87 (4): 25–31.
17. Milavec M., Dobnik D., Yang L., Zhang D., Gruden K., Zel J. GMO quantification: valuable experience and insights for the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; 406(26):6485–97.
18. Li P., Jia J., Jiang L., Zhu H., Bai L., Wang J., et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of the GMO carnation (*Dianthus caryophyllus*) variety Moonlite based upon the 5'-transgene integration sequence. *Genet. Mol. Res.* 2012; 11(2):1117–29.
19. Fu W., Zhu P., Wang C., Huang K., Du Z., Tian W., et al. A highly sensitive and specific method for the screening detection of genetically modified organisms based on digital PCR without pretreatment. *Sci. Rep.* 2015; 5:12715.
20. Xu J., Miao H., Wu H., Huang W., Tang R., Qiu M., et al. Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *Biosens. Bioelectron.* 2006; 22(1):71–7.
21. Salisu I.B., Shahid A.A., Yaqoob A., Ali Q., Bajwa K.S., Rao A.Q., et al. Molecular approaches for high throughput detection and quantification of genetically modified crops: a review. *Front Plant Sci.* 2017; 8:1670.
22. Chhabra R., Randhawa G.J., Bhoge R.K., Singh M. Qualitative and quantitative PCR-based detection methods for authorized genetically modified cotton events in India. *J. AOAC Int.* 2014; 97:1299–309.
23. Grohmann L., Brünen-Nieweler C., Nemeth A., Waiblinger H.-U. Collaborative trial validation studies of real-time PCR-based GMO screening methods for detection of the bar gene and the ctp2-cp4epsps construct. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(19):8913–20.
24. Zhang M., Yu Y., Gao X., Zhang K., Luan F., Zhu Y., et al. Event-specific quantitative detection of genetically modified wheat B72-8-11 based on the 3' flanking sequence. *Eur. Food Res. Technol.* 2015; 240(4):775–82.
25. Datukishvili N., Kutateladze T., Gabriadze I., Bitskinashvili K., Vishnepolsky B. New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in foods. *Front. Microbiol.* 2015; 6:757.
26. Peng C., Wang P., Xu X., Wang X., Wei W., Chen X., et al. Development of a qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms. *SpringerPlus.* 2016; 5(1):889.
27. Demeke T., Dobnik D. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018; 410(17):4039-50.

28. Heide B.R., Heir E., Holck A. Detection of eight GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis. // Eur. Food Res. Technol. 2008; 227(2):527–35.
29. Dominguez Vega E., Marina M. L. Characterization and study of transgenic cultivars by capillary and microchip electrophoresis. Int. J. Mol. Sci. 2014. 15(12):23851–77.
30. Basak S., Ehtesham N.Z., Sesikeran B., Ghosh S. Detection and identification of transgenic elements by fluorescent-PCR-based capillary gel electrophoresis in genetically modified cotton and soybean. J. AOAC Int. 2014; 97:159–65.
31. Holck A.L., Pedersen B.O. Simple, sensitive, accurate multiplex quantitative competitive PCR with capillary electrophoresis detection for the determination of genetically modified maize. Eur. Food Res. Technol. 2011; 233:951–61.
32. Nadal A., Esteve T., Pla M. Multiplex polymerase chain reaction-capillary gel electrophoresis: a promising tool for GMO screening-assay for simultaneous detection of five genetically modified cotton events and species. J. AOAC Int. 2009; 92(3):765–72.
33. Fraiture M.-A., Herman P., Taverniers I., De Loose M., Deforce D., Roosens N.H. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. Biomed. Res. Int. 2015; 2015:392872.
34. Chen X., Wang X., Jin N., Zhou Y., Huang S., Miao Q., et al. Endpoint visual detection of three genetically modified rice events by loop-mediated isothermal amplification. Int. J. Mol. Sci. 2012; 13:14421–33.
35. Li Q., Fang J., Liu X., Xi X., Li M., Gong Y., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of cry1Ab gene in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). Eur. Food Res. Technol. 2013; 236(4):589–98.
36. Zhou D., Guo J., Xu L., Gao S., Lin Q., Wu Q., et al. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugar-cane. Sci. Rep. 2014; 4:4912.
37. Huang X., Chen L., Xu J., Ji H.-F., Zhu S., Chen H. Rapid visual detection of phytase gene in genetically modified maize using loop-mediated isothermal amplification method. Food Chem. 2014; 156:184–9.
38. Di H., Shi L., Shen H., Yan H., Meng H., Li L., et al. Rapid detection of genetically modified ingredients in soybean products by real-time loop-mediated isothermal amplification. J. Food Nutr. Res. 2014; 2(7):363–8.
39. Turkec A., Lucas S. J., Karacanli B., Baykut A., Yuksel H. Assessment of a direct hybridization microarray strategy for comprehensive monitoring of genetically modified organisms (GMOs). Food Chem. 2016; 194:399–409.
40. Xu X., Li Y., Zhao H., Wen S.Y., Wang S.Q., Huang J., et al. Rapid and reliable detection and identification of GM events using multiplex PCR coupled with oligonucleotide microarray. J. Agric. Food Chem. 2005; 53:3789–94.
41. Yang L., Wang C., Holst-Jensen A., Morisset D., Lin Y., Zhang D. Characterization of GM events by insert knowledge adapted resequencing approaches. Sci. Rep. 2013; 3:2839.
42. Stave J.W. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations, and practical considerations. J. AOAC Int. 2002; 85(3):780–6.

Поступила/Received: 29.10.2018
Принята в печать/Accepted: 22.05.2019