

ОБЛАП Р.В., канд. біол. наук; НОВАК Н.Б., канд. с.-г. наук

ДП «Укрметртестстандарт», м. Київ

ДИМАНЬ Т.М., д-р с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНОЇ КУКУРУДЗИ ЛІНІЇ MON 810 У ПРОДОВОЛЬЧІЙ СИРОВИНІ ТА ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ПЛР-РЧ

Розроблено тест-систему для ідентифікації та кількісного визначення генетично модифікованої кукурудзи лінії MON 810 за трансформаційною подією методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (Real-Time PCR). Розроблена тест-система за своїми характеристиками відповідає вимогам міжнародних стандартів щодо проведення ПЛР-аналізу для якісного та кількісного визначення ГМО в продовольчій сировині і харчових продуктах. Тест-систему адаптовано під більшість приладів (Bio-Rad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технологія), якими обладнано діагностичні лабораторії України. Розроблена система значно дешевша порівняно з тест-системами, наявними нині на українському ринку.

За допомогою розробленої системи проведено моніторинг харчових продуктів та продовольчої сировини на наявність генетично модифікованої кукурудзи. Отримані результати свідчать про доцільність контролю харчової продукції щодо вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО).

**Ключові слова:** генетично модифіковані організми, полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу, кукурудза лінії MON 810, харчові продукти та продовольча сировина.

**Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій.** У практиці сільського господарства дедалі частіше використовують сучасні біотехнології. За останні 17 років розвитку цієї галузі площі, відведені під генетично модифіковані (ГМ) культури, зросли з 1,7 до 170 млн га [2]. Поряд з соєю, бавовною і ріпаком однією з найпоширеніших біотехнологічних культур є кукурудза. 2011 року посівні площі під ГМ кукурудзою досягли 51 млн га, що становило 32 % від усіх посівних площ, відведених під біотехнологічні культури. ГМ кукурудзу вирощують у 16 країнах світу, а найбільші її площі зафіксовано у США (33,9 млн га), Бразилії (9,1 млн га), Аргентині (3,9 млн га), Південній Африці (1,9 млн га) і Канаді (1,3 млн га) [9].

Трансгенну кукурудзу лінії MON 810 (YieldGard®) було розроблено фірмою Monsanto Canada Inc. Створення цієї лінії базується на технології рекомбінантних ДНК шляхом введення гена *cryIA(b)*, який було виділено з ґрунтової бактерії *Bacillus thuringiensis ssp. штам*у Kurstaki HD-1. Продукт цього гена є природним інсектицидом і має активність проти деяких представників лускокрилих комах, включаючи совку (*Corn earworm*) та кукурудзяного метелика (*Ostrinia nubilalis*, ЕСВ). Останній – один із основних видів-шкідників кукурудзи в Україні. Експресія білка δ-ендотоксину *cryIA(b)* захищає рослини від ураження шкідниками і дає змогу уникати застосування хімікатів під час їх вирощування [1, 3].

США розпочали вирощування кукурудзи лінії MON 810 з липня 1996 року. Комерціалізацію цієї лінії кукурудзи в Європейському Союзі було дозволено згідно з рішенням Комісії 98/294/ЕС від 22 квітня 1998 року. Нині використання MON 810 дозволено у 23 країнах світу. ГМ кукурудзу MON 810 застосовують, головним чином, як корм для худоби у вигляді борошна грубого помолу та силосу, а також у харчовій промисловості (кукурудзяна олія, свіже або висушене насіння) [1, 3, 10].

Стосовно України, офіційні дані щодо вирощування ГМ кукурудзи відсутні. Однак дослідження зразків кукурудзи вітчизняного виробництва на вміст ГМО упродовж 2007–2008 років, проведені в лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметртестстандарт», засвідчили наявність у них генетичного матеріалу кукурудзи лінії MON 810.

**Метою** роботи було розроблення вітчизняної тест-системи для якісного та кількісного визначення генетично модифікованої кукурудзи лінії MON 810 та моніторинг її наявності в харчових продуктах та продовольчій сировині.

**Матеріали і методи досліджень.** Дослідження проводили у лабораторії молекулярно-генетичних досліджень науково-дослідного центру випробувань продукції ДП «Укрметртестстандарт», яка акредитована Національним агентством акредитації України на компетентність відповідно до вимог ДСТУ ISO / ІЕС 17025-21.

Матеріалом для виділення геномної ДНК слугували стандартні референтні зразки кукурудзи MON 810 [4], харчові продукти та продовольча сировина, які містять кукурудзу. ДНК виділяли методом СТАБ-преципітації із власними модифікаціями. Концентрацію та чистоту виділеної нуклеїнової кислоти визначали методом спектрофотометрії за довжини хвилі  $\lambda=260$  нм [5].

Під час розроблення ПЛР-системи у режимі реального часу для кількісного визначення кукурудзи лінії MON 810 було використано технологію *TaqMan* [6]. ПЛР-ампліфікацію проводили за допомогою приладів iQCyler (BioRad, Франція) та CFX96 (BioRad, США). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 2 мкл ДНК, 10 мМ Трис-НСІ (рН 8,3), 50 мМ КСІ, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ дНТФ суміші, 5 пкМ кожного з праймерів, 2,5 пкМ зонду та 1 од. Таq-полімерази. Олігонуклеотидні зонди були мічені флуоресцентними барвниками FAM, JOE, ROX та гасниками флуоресценції BHQ1 і BHQ2. Температурний режим складався з початкової денатурації упродовж 3 хв за 95 °С та наступних 45 циклів: денатурації – 15 с за 95 °С, відпалу праймерів та синтезу – 40 с за 60 °С. Флуоресцентний сигнал вимірювали по завершенню стадії відпалу праймерів та синтезу у кожному циклі ампліфікації.

Для виготовлення тест-систем використовували реагенти фірм «Sigma», «Fluka» (США), «Fermentas» (Литва) та «Синтол» (Росія).

Межу чутливості розробленої системи визначали за допомогою абсолютного кількісного аналізу. Як абсолютні стандарти використовували плазмідну ДНК (pGEM-T) з клонованими ПЛР-фрагментами гена лектину сої (Lec) та послідовності трансформаційної події, яка характерна для кукурудзи лінії MON 810 [4, 5]. Кількісне визначення ГМО проводили шляхом побудови калібрувальної кривої за п'ятьма стандартними зразками, що містили кукурудзу лінії MON 810 в кількостях 0,1; 0,5; 1; 2 та 5 % [7].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Тест-систему для визначення кукурудзи лінії MON 810 було розроблено в двох виконаннях: «Кукурудза лінія MON 810 (ГМ ідентифікація)» та «Кукурудза лінія MON 810 (ГМ кількість)». Розроблена система є мультилокусною, оскільки уможливує проведення двох незалежних реакцій в одній пробірці. Одна реакція направлена на виявлення лінієспецифічної ділянки, яка включає місце з'єднання ГМ-конструкту та ДНК рослини, друга – на виявлення фрагмента гена алкогольдегідрогенази (*Adh*) кукурудзи для ендогенного видоспецифічного контролю перебігу ПЛР. Перебіг кожної з двох реакцій відстежували за допомогою специфічного зонду, міченого заданим флуоресцентним барвником. Для виявлення лінієспецифічної ДНК використовували зонд, мічений барвником ROX, для фрагмента гена *Adh* – JOE [11].

Оцінювання ефективності роботи тест-системи, а саме специфічності, чутливості, межі детектування, повторюваності та відтворюваності результатів аналізу, проводили відповідно до вимог Об'єднаного Центру досліджень ГМО (JRC, ЕС) з використанням сертифікованих референтних зразків Бельгійського інституту контрольних матеріалів і методів (IRMM, ЕС). ДНК кожного зразка екстрагували у двох повторностях, кожен випробувальний зразок аналізували у двох повторностях, стандартні зразки – у трьох повторностях.

Оптимізацію умов ампліфікації проводили за такими параметрами як температура відпалу праймерів, концентрація MgCl<sub>2</sub>, концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Оптимальна температура, за якої підібрані нами праймери найбільш ефективно працювали, становила 60 °С. Із чотирьох обраних концентрацій MgCl<sub>2</sub> (1,5; 2; 2,5 і 3 мМ) найкращі результати було отримано за концентрації 2,5 мМ. Проведення серії реакцій з різними комбінаціями концентрацій праймерів і зондів у межах від 2 до 20 пкМ уможливило досягнення мінімальної величини Ст і максимального значення  $\Delta Rn$  за постійної концентрації матриці-мішені. Оптимальне значення концентрації становило 10 пкМ для праймерів та 5 пкМ для зондів.

Експериментальне визначення специфічності проводили шляхом тестування таких видів рослин: рис (*Oryza sativa*), жито (*Secale cereal*), пшениця (*Triticum aestivum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), овес (*Avena sativa*), гречка (*Fagopyrum esculentum*), помідори (*Lycopersicon esculentum*), картопля (*Solanum tuberosum*), ріпак (*Brassica napus*), соя (*Glycine max*). Також було перевірено ГМ лінії ріпаку RT73, сої GTS40-3-2 та кукурудзи: Bt176, Bt11, Das59122-7, Nk603, Ga21, T25, Mir604. Перехресних реакцій при цьому виявлено не було.

Межу чутливості розробленої тест-системи визначали шляхом приготування серії розведень абсолютних стандартів (від 10<sup>1</sup> до 10<sup>9</sup> копій плазмідної ДНК). Межа чутливості системи як для

трансформаційної події, так і ендogenous контролю становила близько 20 копій ДНК-мішені, що відповідає вимогам ДСТУ ISO 21570:2008 [7].

Кількісне визначення базується на обчисленні відношення кількості генетично-модифікованої ДНК до загальної кількості ДНК аналізованої ГМ рослини, виражене у відсотках. Тому для проведення кількісного аналізу будували калібрувальний графік за стандартними зразками, що містили 0,1; 0,5; 1; 2 і 5 % ГМ кукурудзи лінії MON 810. Для цього кількість генетично-модифікованого матеріалу нормалізували до кількості рослинного матеріалу для отримання величини  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = Ct_{ROX} - Ct_{JOE}$ ). За значеннями  $\Delta Ct$  стандартних зразків будували калібрувальну криву – графік залежності  $\Delta Ct$  від  $\log$  концентрації стандартних зразків. Відносно цієї кривої визначали абсолютні значення досліджуваних зразків за величинами їх  $\Delta Ct$ .

Моніторинг харчових продуктів та продовольчої сировини, проведений упродовж 2007–2011 років, виявив наявність в Україні біотехнологічних культур (табл. 1). Ідентифікація ліній ГМ кукурудзи, яка зустрічалась у харчових продуктах (крупа, кукурудзяне борошно, заморожені овочеві суміші) і продовольчій сировині (цільне зерно), показала, що більш ніж у 70 % випадків це лінія MON 810.

Таблиця 1 – Моніторинг харчових продуктів та продовольчої сировини на вміст ГМО

Рік	Кількість досліджених зразків	Виявлено ГМО к-ть зразків/%	Харчові продукти			Сировина			MON 810 >0,9%
			1*	2*	3*	1	2	3	
2007	413	90/22	64	8	6	26	7	7	3
2008	1177	97/8	21	3	2	76	46	35	11
2009	2126	107/5	17	4	3	90	50	42	18
2010	2570	204/8	71	5	3	133	41	29	1
2011	1866	59/3	3	3	3	56	20	14	4

\* 1 – загальна кількість виявлених ГМО, 2 – кількість зразків ГМ кукурудзи, 3 – кількість виявлених зразків кукурудзи лінії MON 810

На жаль, цілісну картину розповсюдження ГМ ліній кукурудзи (а також інших культур) у масштабах всієї країни, відстежити неможливо, оскільки в більшості лабораторій України ідентифікацію певних ліній ГМ культур не проводять.

Питання щодо того, яким чином ГМ сировина потрапляє на український ринок, залишається відкритим. Частково це результат неконтрольованого ввезення ГМ насіння у недалекому минулому, коли в країні була відсутня законодавча база щодо обігу ГМ культур. Про це свідчить той факт, що більшість виявленого ГМ-позитивного насіннєвого матеріалу містило ГМО в кількостях, які не перевищували 0,9 %. Частково це продукти переробки сировини, яка потрапляла з інших країн, де вирощування біотехнологічних культур не заборонено.

Як свідчать дані таблиці 1, за останні роки ситуація з поширенням ГМО змінилась. Сьогодні ГМ інгредієнти майже відсутні в харчових продуктах, а сільськогосподарську сировину рослинного походження ретельно перевіряють у лабораторіях України.

**Висновки.** Таким чином, було розроблено вітчизняну діагностичну тест-систему на основі методу ПЛР у режимі реального часу, яка дає змогу ідентифікувати генетично модифіковану кукурудзу лінії MON 810 за трансформаційною подією та визначати її кількість у продовольчій сировині та харчових продуктах.

Розроблена тест-система за своїми характеристиками відповідає вимогам міжнародних стандартів щодо проведення ПЛР-аналізу для якісного та кількісного визначення ГМО в продовольчій сировині і харчових продуктах. Тест-систему адаптовано під більшість приладів (Bio-Rad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технологія), якими обладнано діагностичні лабораторії України. Розроблена система значно дешевша порівняно з тест-системами, присутніми нині на українському ринку.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Генетически модифицированные источники пищи: оценка безопасности и контроль / под ред. В.А. Тутельяна. – РАМН, 2007. – 442 с.
2. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/default.asp>, офіційний сайт міжнародної служби з комерційного застосування агробіотехнологічних культур (ISAAA).

3. Сорочинський Б.В. Генетично модифіковані рослини / Б.В. Сорочинський, О.О. Данильченко, Г.В. Кріпка. – К.: Фітосоціоцентр, 2005. – 204 с.
4. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Якісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти / ДСТУ ISO 21569:2008. – Київ: Держспоживстандарт України. – 2009. – 48 с.
5. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Екстрагування нуклеїнової кислоти / ДСТУ ISO 21571:2008. – Київ: Держспоживстандарт України. – 2009. – 31 с.
6. ПЦР в реальному часі / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др.; под редакцией Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2009. – 223 с.
7. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Кількісні методи на основі аналізування нуклеїнової кислоти / ДСТУ ISO 21570:2008. – Київ: Держспоживстандарт України. – 2009. – 70 с.
8. Рослинництво України. Статистичний збірник. – К.: Державний комітет статистики України, 2011. – 99 с.
9. <http://faostat.fao.org>, FAO, Statistics Division (FAOSTAT).
10. James Clive. Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops: 2011. ISAAA Brief №43. – Ithaca, New York: ISAAA, 2011. – 36 p.
11. «Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах. Технічні умови» / ТУ У 24.6-02568182-001:2011. – Київ: ДП «Укрметртест-стандарт». – 2012. – 52 с.

**Идентификация генетически модифицированной кукурузы линии MON 810 методом ПЦР-РВ и мониторинг ее использования в продуктах питания**

**Р.В. Облап, Н.Б. Новак, Т.Н. Дымань**

Разработана тест-система для идентификации и количественного определения генетически модифицированной кукурузы линии MON 810 по трансформационному событию методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Разработанная тест-система по своим характеристикам отвечает требованиям международных стандартов к проведению ПЦР-анализа для качественной и количественной идентификации ГМО в продовольственном сырье и пищевых продуктах. Тест-система адаптирована под большинство приборов (Bio-Rad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технология), которыми оборудованы диагностические лаборатории Украины. Разработанная система значительно дешевле по сравнению с тест-системами, присутствующими на украинском рынке.

С помощью разработанной системы проведен мониторинг пищевых продуктов и продовольственного сырья на наличие генетически модифицированной кукурузы. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности контроля пищевой продукции на содержание генетически модифицированных компонентов.

**Ключевые слова:** генетически модифицированные организмы, полимеразная цепная реакция, кукуруза линии MON 810, пищевые продукты и продовольственное сырье.

**The identification of genetic modified maize MON 810 by Real-Time PCR method and monitoring of its using in food products**

**R. Oblap, N. Novak, T. Dyman**

The test-system for the qualitative and quantitative detection of genetically modified maize of line MON 810 on transformative event by polymerase chain reaction in real time was developed. The developed test system on its characteristics meets requirements of international standards for PCR analysis for qualitative and quantitative GMO determination in raw materials and foodstuff. Test system customized for most devices (Bio-Rad, Applied Biosystems, Corbett Research, Syntol, DNA-technology) used in diagnostic laboratories in Ukraine. The system is much cheaper compared to the test systems that are present today on the Ukrainian market.

By means of this system the monitoring of foodstuffs and raw material on genetic modified maize presence was performed. Obtained results showed the suitability of the measures taken.

**Key words:** genetically modified organisms, polymerase chain reaction, Real-Time polymerase chain reaction, maize line MON 810, raw material, foodstuff.