

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ**

ОБЛАП РУСЛАН ВАСИЛЬОВИЧ

УДК 613.2/.3-027.45:577.2(043)

**МЕТОДОЛОГІЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ОЦІНЮВАННЯ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ ПРОДУКЦІЇ**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора сільськогосподарських наук

с. Чубинське Київської області – 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Білоцерківському національному аграрному університеті
Міністерства освіти і науки України

Науковий консультант: доктор сільськогосподарських наук, професор
Димань Тетяна Миколаївна,
Білоцерківський національний аграрний університет
Міністерства освіти і науки України,
проректор з освітньої, виховної та міжнародної діяльності

Офіційні опоненти: доктор сільськогосподарських наук, професор
Копилов Кирило В`ячеславович,
Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця
Національної академії аграрних наук України,
головний науковий співробітник відділу генетики та
біотехнології

доктор сільськогосподарських наук, професор
Супрович Тетяна Михайлівна,
Подільський аграрно-технічний університет
Міністерства освіти і науки України,
завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного
забезпечення кінологічної служби Національної поліції
України

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Ісаснков Станіслав Валентинович,
Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України,
завідувач відділу рослинних харчових продуктів та
біофортificaції

Захист відбудеться 12 травня 2021 року о 13 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 27.355.01 Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН за адресою: вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН за адресою: вул. Погребняка, 1, с.Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321.

Автореферат розіслано 10 квітня 2021 року

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

О.Д. Бірюкова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Безпечність та якість сільськогосподарської сировини і харчової продукції є однією з вирішальних складових економічної безпеки кожної держави і визначається спроможністю країни ефективно контролювати виробництво, експорт та імпорт продовольства. У розвинутих країнах існує багаторівнева система захисту населення від недоброякісних товарів, яка спирається на контроль якості. Моніторинг і контроль безпечності та якості сільськогосподарської сировини і харчової продукції неможливі без наявності відповідних аналітичних методів аналізу та діагностичних тест-систем. З огляду на це, сьогодні розробленню сучасних високоефективних підходів та методів детектування показників безпечності та якості приділяють велику увагу.

Прогрес в освоєнні методів молекулярно-генетичної діагностики став важливим стимулом для розроблення і впровадження в практику високочутливих методик оцінювання якості і експертизи харчової продукції, основаних на методі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Зазначений метод успішно використовують для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів у продукції агропромислового комплексу. Особливе значення молекулярно-генетичні методи мають для ідентифікації біологічних зразків мікроорганізмів (як патогенних, так і технологічно корисних), оскільки не потребують попереднього культивування і виділення видоспецифічних фрагментів за сумарною ДНК і ампліфікації генів, що кодують рРНК. За допомогою молекулярно-генетичних маркерів успішно ідентифікують фальсифікацію видового складу м'ясних продуктів, присутність харчових алергенів тваринного і рослинного походження.

Великі перспективи в методологічному аспекті мають такі модифікації ПЛР як *SYBR[®]Green* та *TaqMan[®]*. Завдяки економії виробничих площ, зменшенню кількості обслуговуючого персоналу та попиту на кількісне визначення генетичного матеріалу (ДНК/РНК) ці методи успішно застосовують у провідних санітарно-епідемічних, діагностичних і науково-дослідних центрах розвинених країн світу, витісняючи «класичний» формат ПЛР.

Роботи вітчизняних і зарубіжних науковців спрямовано на дослідження інформативності ідентифікаційних генетичних маркерів, можливостей використання в єдиному комплексі їх значної кількості, розроблення підходів до автоматизації. Однак залишається ще низка проблемних питань, зокрема щодо стандартизації виконання процедур, мінімізації ризику помилок за рахунок суб'єктивних факторів, досягнення максимальної порівнянності результатів досліджень, уникнення хибнопозитивних результатів чи інгібування ПЛР внаслідок контамінації та ін.

Виходячи із зазначеного, теоретичне обґрунтування методології молекулярно-генетичного оцінювання показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини і харчової продукції, практична реалізація її підходів у вигляді розроблення вітчизняних діагностикумів належить до найактуальніших наукових завдань, що й обумовило напрям виконаної дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Загальні положення дисертаційної роботи розроблено та реалізовано на базі кафедри екотрофології та науково-дослідної лабораторії Білоцерківського національного

аграрного університету у період 2012–2014 років за завданням «Розроблення діагностичних тест-систем на основі ПЛР у реальному часі для оцінювання безпеки та якості харчових продуктів» (№ ДР 0113U005453), а також за тематикою досліджень науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень Українського науково-методичного центру оцінки відповідності та випробувань харчових продуктів, виробів, що контактують з харчовими продуктами, іграшок, парфумерно-косметичної продукції та продукції побутової хімії (УкрПРОДТЕСТ) ДП «Укрметрестестстандарт» у період 2012–2019 років.

Мета і завдання досліджень. Мета роботи – теоретично обґрунтувати і розробити методологію використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів та методів їх аналізу для оцінювання показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини тваринного і рослинного походження.

Для досягнення означеної мети було поставлено наступні завдання:

- уніфікувати та оптимізувати сучасні підходи до визначення показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини і харчової продукції за використання молекулярно-генетичних маркерів та методів аналізу;
- розробити та відпрацювати методологію дослідження генетичної структури популяцій великої рогатої худоби за генами господарсько-корисних ознак;
- визначити генетичну структуру двох популяцій української чорно-рябої молочної породи за локусами к-казеїну (*CSNK*), β -лактоглобуліну (*BLG*) та пролактину (*PRL*) як потенційними генами-маркерами молочної продуктивності;
- встановити взаємозв'язки між генотипами і комплексами генотипів досліджених QTL та основними параметрами молочної продуктивності (загальний надій, масова частка жиру та білка) корів української чорно-рябої молочної породи;
- дослідити зв'язок технологічних характеристик молока з окремими генотипами генів *CSNK*, *BLG* та *PRL*;
- запропонувати молекулярно-генетичні маркери для визначення провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ, BLV) методом молекулярно-генетичного аналізу на основі технології *TaqMan*[®] ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ);
- провести порівняльні випробування молекулярно-генетичного і серологічного методів аналізу ВЛ ВРХ та відпрацювати ПЛР-РЧ методику визначення цього збудника у молоці корів;
- розробити методологію визначення корисної мікрофлори у складі молочної продукції на основі використання молекулярно-генетичних маркерів та технології *SYBR*[®]*Green* методу ПЛР-РЧ;
- відпрацювати схему ідентифікації бактерій родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Enterococcus* за допомогою ПЛР-РЧ та дослідити можливість здійснення кількісного оцінювання вмісту мікроорганізмів у молочних продуктах;
- дослідити проблематику визначення фальсифікації видової належності м'яса (курятина, свинина, яловичина) за допомогою молекулярно-генетичних маркерів та розробити і запропонувати до використання мультиплексну тест-систему на основі методу ПЛР-РЧ, яка б уможливлювала одночасну детекцію трьох різних ДНК-мішеней;

– провести моніторинг існуючих в Україні ліній генно-модифікованих рослин (ГМР, ГМО) та відпрацювати схему застосування різних типів молекулярно-генетичних маркерів для здійснення якісного та кількісного аналізу сільськогосподарської продукції на вміст елементів генно-інженерних конструктів;

– розробити методологію з визначення біотехнологічних рослин за допомогою методів молекулярно-генетичного аналізу та запровадити у виробництво серію тест-систем для якісного та кількісного визначення ГМО в сільськогосподарській сировині, кормах для тварин і харчовій продукції методом ПЛР-РЧ;

– дослідити питання патогенетичних реакцій глютену, пов'язаних з виникненням захворювання на целіакію у людей, підібрати молекулярно-генетичні маркери та розробити молекулярно-генетичний підхід до визначення глютену в сільськогосподарській сировині і харчовій продукції;

– здійснити порівняльний аналіз чутливості, специфічності та відтворюваності технології *TaqMan*[®] методу ПЛР-РЧ і класичних методів діагностики зоонозних харчових бактеріальних патогенів, підібрати молекулярно-генетичні маркери і розробити серію мультиплексних тест-систем для визначення *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* та *Shigella spp.*

Об'єкт дослідження – генетичний поліморфізм послідовностей ДНК в геномах рослин, тварин і мікроорганізмів, процес оцінювання безпечності і якості сільськогосподарської продукції за сукупністю молекулярно-генетичних маркерів.

Предмет дослідження – частоти алелів та генотипів QTL, комплекси генотипів, показники молочної продуктивності великої рогатої худоби, різні типи молекулярно-генетичних маркерів, ДНК-маркери вірусів, бактерій, рослин та тварин.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні – виділення ДНК, електрофоретичне розділення молекул, використання різновидів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР-ПДРФ, технологій *TaqMan*[®] та *SYBR*[®]*Green* ПЛР у реальному часі), молекулярне клонування у плазмідний вектор; біоінформатичні – вирівнювання нуклеотидних послідовностей ДНК, конструювання специфічних олігонуклеотидних праймерів та зондів; популяційно-генетичні – визначення частот генотипів та алелів; зоотехнічні – визначення показників продуктивності ВРХ; статистичні – біометрична обробка даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше науково обґрунтовано методологію застосування молекулярно-генетичних маркерів та методів генетичного аналізу для оцінювання ряду показників безпечності та якості сільськогосподарської продукції.

Аргументовано зв'язок різних генотипів і комплексів генотипів QTL (*CSNK*, *BLG*, *PRL*) з господарсько-корисними ознаками великої рогатої худоби – молочною продуктивністю (надій, масова частка жиру і білка в молоці) та технологічними властивостями (сиропридатністю) їх молока. Обґрунтовано найбільш перспективні поєднання генотипів для ефективного використання у селекційній роботі з метою підвищення молочної продуктивності.

Експериментально обґрунтовано і доведено можливість ідентифікації бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus* у готовій молочній продукції під

час контролю складу молочної мікрофлори, а також під час створення нових заквасок, пробіотиків і пробіотичних продуктів за допомогою технології SYBR®Green методу ПЛР-РЧ. Як молекулярно-генетичні маркери було обрано ділянки генів 16S рРНК та фактору елонгації Tu.

Встановлено найбільш інформативні молекулярно-генетичні маркери видової ідентифікації м'яса тварин, що локалізовані в межах мітохондріальних генів цитохрому b (*cytb*) курей і свиней та сателітної IV ДНК (1.709 satellite IV DNA family) ВРХ. Розроблено мультиплексну ПЛР-РЧ тест-систему «М'ясо-тест» на основі технології TaqMan® методу ПЛР-РЧ, яка уможливорює одночасну ідентифікацію трьох різних ДНК-мішеней, та дає змогу визначати видову належність м'яса курятини, свинини та яловичини у тваринній сировині, кормах для тварин та готовій до споживання харчовій продукції.

Оцінено інформативність різних типів молекулярно-генетичних маркерів, що використовуються під час виявлення генно-інженерних конструктів біотехнологічних рослин та розроблено методологію з визначення ГМО з врахуванням типу сільськогосподарських культур, що вирощуються в Україні. Вперше в Україні розроблено та впроваджено у виробництво серію тест-систем «ГМО скринінг», «ГМО кількість» та «ГМО ідентифікація» на основі технології TaqMan® методу ПЛР-РЧ загальною кількістю 51 найменування.

Проведено аналіз з виявлення та ідентифікації у сільськогосподарській сировині і харчовій продукції злакових культур, глютен у складі яких пов'язаний з виникненням захворювання на целіакію у людей. Визначено ДНК-маркери (ω-гліадин пшениці, ω-секалін жита, В1 гордеїн ячменю, авенін вівса) та розроблено мультиплексну тест-систему «Глютен-скринінг» на основі технології TaqMan® методу ПЛР-РЧ, яка уможливорює ідентифікацію навіть слідових кількостей пшениці, жита, ячменю і вівса.

Визначено та запропоновано до використання молекулярно-генетичні маркери (*hly*, *invA*, *ipaH*), які уможливлюють ідентифікацію збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу в сільськогосподарській сировині, кормах для тварин та харчовій продукції. Розроблено і рекомендовано до практичної реалізації три мультиплексні тест-системи на основі технології TaqMan® методу ПЛР-РЧ: «*L. Monocytogenes*-ідентифікація», «*Salmonella spp.*-ідентифікація» та «*Shigella spp.*-ідентифікація».

Практичне значення одержаних результатів. Використання отриманих в дисертаційній роботі результатів досліджень з визначення особливостей генетичної структури поголів'я української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби, а також встановлення взаємозв'язку між виявленими генотипами та комплексними генотипами поліморфних локусів (*CSNK*, *BLG*, *PRL*) та технологічними властивостями (сиропридатністю) молока дасть змогу проводити селекційну роботу в бажаному напрямі, що, своєю чергою, сприятиме збільшенню продуктивного потенціалу тварин.

Запропоновано концептуальний підхід з оптимізації техніки визначення збудника лейкозу великої рогатої худоби у коров'ячому молоці за допомогою технології TaqMan® методу ПЛР-РЧ та доведено можливість її застосування як у

комплексі протилейкозних заходів у господарствах, так і безпосередньо під час контролю безпечності продукції.

Застосування розробленої тест-системи «М'ясо-тест» у практиці випробувальних лабораторій дасть змогу здійснювати контроль за фальсифікацією м'яса у тваринній сировині, кормах та харчовій продукції.

За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи на виробництво тест-систем «ГМО скринінг», «ГМО кількість», «ГМО ідентифікація» отримано ТУ У 24.6-02568182-001:2011, ТУ У 20.1-40719638-001:2019 та патент на корисну модель. Розроблена серія тест-систем використовується у близько тридцятих акредитованих за ДСТУ ISO/IEC 17025 випробувальних лабораторіях України різних систем підпорядкування. Упродовж 2007–2017 рр. за використання розроблених тест-систем здійснено контроль за обігом ГМО в країні шляхом перевірки сільськогосподарської сировини та харчової продукції.

Затверджено методику виконання вимірювань (МВИ 17/59-12) з визначення глютену злакових культур за допомогою ПЛР-РЧ тест-системи «Глютен-скринінг», а розроблений діагностикум може бути рекомендований для здійснення контролю харчової продукції на вміст глютену.

Апробація роботи трьох ПЛР-РЧ тест-систем з визначення *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* на контрольних зразках показала високу специфічність, чутливість та відтворюваність результатів аналізу, що є підставою рекомендувати їх для здійснення контролю сільськогосподарської сировини та харчової продукції на вміст патогенів.

Особистий внесок здобувача. Автором безпосередньо сформульовано методологічну концепцію виконаної роботи, програму комплексних досліджень, проведено патентний пошук, аналіз джерел літератури за темою дисертаційної роботи, розроблено схеми дослідів у лабораторних та виробничих умовах, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, виконано статистичну обробку отриманих даних, сформульовано висновки та пропозиції виробництву, запроваджено у виробництво низку діагностичних тест-систем.

Використання матеріалів спільних досліджень, в яких автор брав участь безпосередньо, погоджено зі співавторами. Одержані наукові результати, що виносяться на захист, є особистим досягненням здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлено і обговорено на засіданнях вчених рад біолого-технологічного та екологічного факультетів Білоцерківського національного аграрного університету та засіданнях науково-технічної ради ДП «Укрметртестстандарт»; Міжнародних науково-практичних конференціях «Проблеми підвищення адаптивного потенціалу системи рослинництва у зв'язку зі змінами клімату» (Біла Церква, 2008); «Екотрофологія. Аспекти продовольчої та харчової безпеки» (Біла Церква, 2009); «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека» (Одеса, 2010); «Шевченківська весна 2012: біологічні науки» (Київ, 2012); «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2012); «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Мінськ, 2012); «Екотрофологія. Прогрес, проблеми, перспективи екологічно безпечного виробництва» (Біла Церква, 2013);

«Новітні досягнення біотехнології» (Київ, 2013); «Якість і безпека харчових продуктів» (Київ, 2013); «Актуальные вопросы биологии, экологии, медицины и фармакологии» (Дніпропетровськ, 2013); «Современные биотехнологии для науки и практики» (Санкт-Петербург, 2014); «Стратегічні напрями розвитку тваринництва в Україні у контексті національної продовольчої безпеки» (Біла Церква, 2014); «Якість і безпека харчових продуктів» (Київ, 2015); «Селекційно-генетична наука і освіта» (Умань, 2016); «Современные биотехнологии для науки и практики» (Санкт-Петербург, 2016); «Продовольчі ресурси: проблеми і перспективи» (Київ, 2016); «Оздоровчі харчові продукти та дієтичні добавки: технології, якість та безпека» (Київ, 2017); «Якість і безпека харчових продуктів» (Київ, 2017); «Проблемы и состояние использования ГМО в пищевых продуктах» (Львів, 2018); IV Всеросійському симпозиумі «Трансгенные растения: технология создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» (Москва, 2012); II Міжнародному симпозиумі «Современные биотехнологии для науки и практики» (Санкт-Петербург, 2015); IV та V Всеукраїнських з'їздах екологів з міжнародною участю «Екологія / Ecology-2013» (Вінниця, 2013, 2015); XIII З'їзді товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (ТМУ) (Ялта, 2013); Всеукраїнських науково-практичних конференціях «Проблеми ветеринарної паразитології та якість і безпека продуктів тваринництва» (Полтава, 2014); «Біологічні дослідження» (Житомир, 2014, 2018); X Всеукраїнських наукових Таліївських читаннях (Харків, 2014); Наукових конференціях молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014» (Київ, 2014); «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (Київ, 2014); «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (Київ, 2016).

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи викладено у 73 наукових працях, із них 2 монографії, 20 – опубліковано у наукових фахових виданнях України, 8 – у виданнях іноземних держав або у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз, 34 – наукові праці апробаційного характеру у збірниках наукових конференцій, з'їздів та симпозиумів, 8 – додатково відображають наукові результати дисертації, 1 – патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 410 сторінках комп'ютерного тексту до списку літературних джерел, містить 83 рисунки, 113 таблиць та складається з анотацій, переліку умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень та їх обговорення, узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел (716 джерел, у тому числі 362 латиницею), а також додатків.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження за темою дисертаційної роботи виконано у Білоцерківському національному аграрному університеті на базі науково-дослідної лабораторії новітніх методів досліджень, а також на базі науково-виробничої лабораторії молекулярно-генетичних досліджень Державного підприємства «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів» (м. Київ). Дослідження з визначення пробіотичних мікроорганізмів проведено у співпраці зі старшим науковим співробітником відділу Фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, канд. біол. наук Л. Б. Зеленою. Популяційно-генетичні дослідження поголів'я української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби та діагностика вірусу ВЛ ВРХ проводилися спільно з науковим співробітником ДП «Укрметртестстандарт», канд. с.-г. наук Н. Б. Новак. Показники молочної продуктивності тварин визначали на базі лабораторії ДП «Галактон» разом із Н. О. Ключаденко. Загальну схему досліджень представлено на рисунку 1.

Для вивчення генетичної структури української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби було досліджено чистопорідне поголів'я тварин двох стад Васильківського (n=251) та Сквирського районів (n=251) Київської області.

Дослідження щодо визначення провірусної ДНК вірусу ВЛ ВРХ проводили на зразках крові та молока, відібраних від тварин української чорно-рябої молочної породи, яка відтворювалася в умовах агростанції «Митниця» Васильківського району Київської області (n=251). Попередньо всіх тварин було протестовано методом РІД-аналізу щодо присутності антитіл до ВЛ ВРХ у рамках регулярних протилейкозних заходів у господарстві.

Дослідження щодо якісної та кількісної оцінки пробіотичних бактерій проводили за використання типових штамів *Bifidobacterium longum* CCM 4990, *Lactobacillus casei subsp. casei* CCM 7088 та *Enterococcus faecalis* CCM 7000, люб'язно наданих Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України (м. Київ).

Дослідження щодо визначення видової належності м'яса у харчових продуктах та кормах, а також присутності глютену злакових культур у харчовій продукції проводили на зразках продукції, закупленої у торговельній мережі.

Під час розроблення серії тест-систем з визначення ГМ рослин було використано сертифікований референтний матеріал, виготовлений Інститутом еталонних матеріалів і вимірів JRC-IRMM (ЄС) та Американською асоціацією хіміків жирно-олійної промисловості AOCS (США), а також зразки харчової продукції та сільськогосподарської сировини, що надходили до лабораторії ДП «Укрметртестстандарт» упродовж 2007–2017 рр.

Зразки ДНК, екстрагованої з культур *L. Monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* та ряду інших мікроорганізмів, були люб'язно надані Державним закладом «Український центр з контролю та моніторингу захворювань Міністерства охорони здоров'я України» (м. Київ).

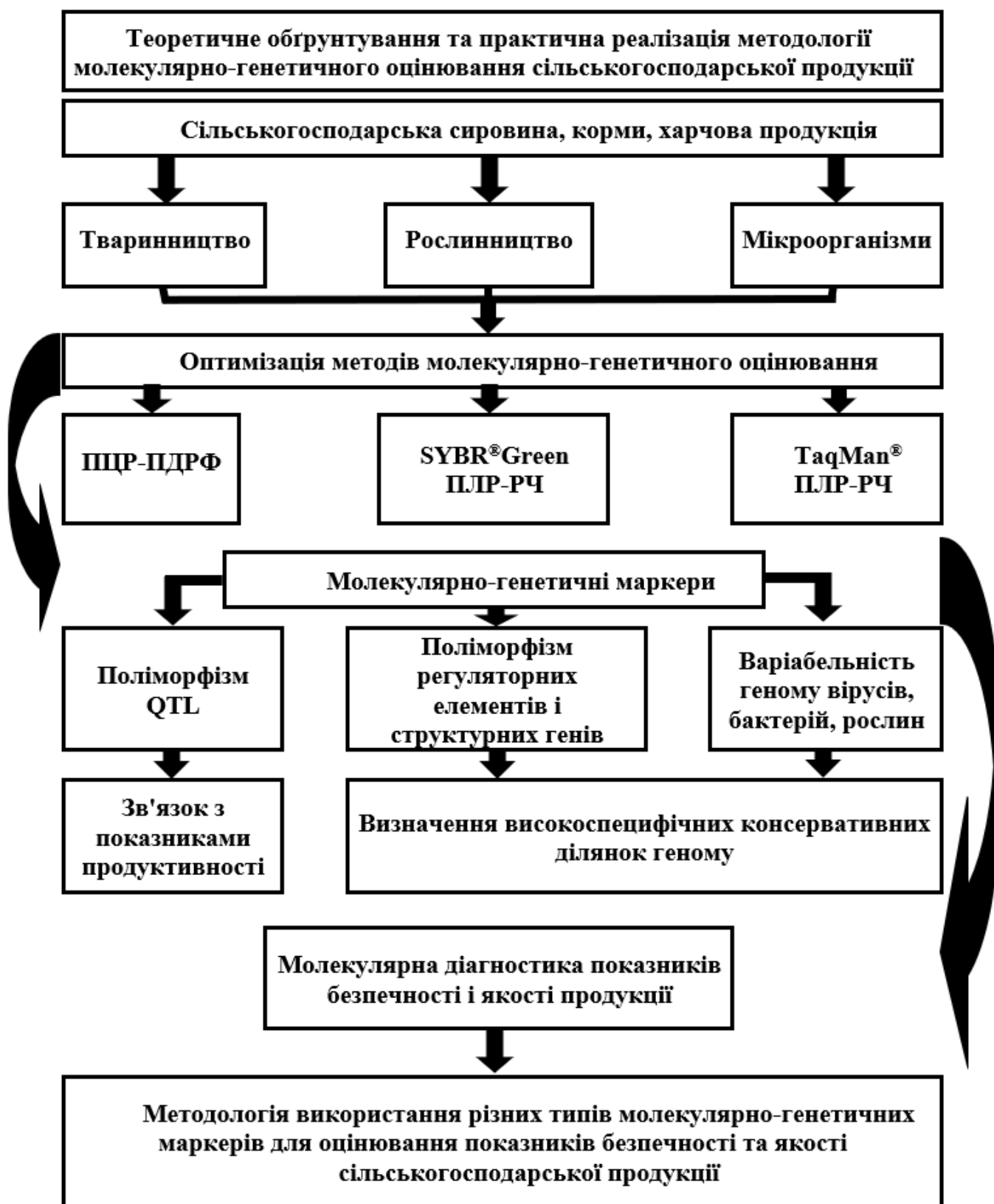


Рис. 1. Загальна схема досліджень

Процедуру екстракції ДНК під час проведення досліджень обирали відповідно до типу матриці – культури бактерій, тканини рослин і тварин, багатокомпонентні суміші харчової продукції. У роботі було застосовано методи фенольно-хлороформної екстракції ДНК (F.M. Ausubel et al., 1987), СТАБ-преципітації (D.B.

Wagner et al., 1987) та сорбції на силікагелі (Boom R. et al., 1990). Також було використано ряд комерційних наборів. Ефективність виділення ДНК визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 260 нм. Отримання генно-інженерних позитивних контрольних зразків здійснювали за стандартною методикою (J. Sambrook, 1989) шляхом використання реагентики pBluescript II SK(+) (Stratagene, США), T4 ДНК лігази (СибЭнзим, РФ), DH5 α *Escherichia coli* (Invitrogen, США).

ПЛР здійснювали за допомогою приладів GeneAmp 2400 (Applied Biosystems, США), ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems, США), iQCycler (BioRad, Франція), CFX96 (BioRad, США) та реагентики «ДиаТак» Taq-полімерази (Амплиценс[®], РФ), AmliTaq[®]Gold-полімерази (Applied Biosystems, США) і Taq ДНК полімерази (Thermo Fisher Scientific, США). Обсяг реакційної суміші становив 25 мкл. Синтез олігонуклеотидів здійснювався компаніями «Metabion international AG» (Німеччина) та «ЗАО Синтол» (РФ).

ПЛР-ПДРФ аналіз поліморфізму локусів кількісних ознак великої рогатої худоби проводили за допомогою ендонуклеаз рестрикції (Fermentas, Литва) з подальшим електрофоретичним розділенням фрагментів рестрикції у 3% агарозному гелі. Розмір фрагментів визначали за використання маркерів молекулярних мас GeneRuler[™] 50bp DNA Ladder та 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Литва). Визначення генотипів особин за кожним із локусів проводили за допомогою співставлення довжин ампліфікованих/рестрикційних фрагментів на електрофореграмах. Оцінювання показників молочної продуктивності ВРХ здійснювали за такими параметрами як загальний надій, масова частка жиру та білка, тривалість сичужного зсідання молока.

ПЛР-ампліфікацію в режимі реального часу проводили за допомогою технологій SYBR[®]Green або TaqMan[®]. У першому випадку використовували Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Bio-Rad, США), у другому – TaqMan-зонди (Metabion international AG, Німеччина; ЗАО Синтол, РФ).

Статистичну обробку даних здійснювали за використання стандартних комп'ютерних програм POPGENE 1.32 і ANOVA (пакет STATISTICA 7). У всіх досліджуваних групах тварин за кожним локусом обчислювали частоти алельних і генотипових варіантів. Статистичну значущість відмінностей частот алелів між вибірками оцінювали за допомогою χ^2 критерію Пірсона. Асоціацію між поліморфними варіантами досліджуваних локусів і ознаками молочної продуктивності аналізували за допомогою GLM-процедури програми STATISTICA. Кореляційний та регресійний аналіз проведено за використання пакету статистичної програми MINITAB 14.

Обробку результатів ПЛР-РЧ здійснювали за використання програмного забезпечення до приладів для проведення ПЛР в реальному часі ABI Prism[®] 7000 SDS Software (v. 1.2.3), iQ[™]5 Optical System Software (v. 2.1) та CFX Manger[™] Software (v. 3.0). Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2013.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ОЦІНЮВАННЯ ПОКАЗНИКІВ БЕЗПЕЧНОСТІ ТА ЯКОСТІ ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА ЗА ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ

Визначення потенціалу молочної продуктивності великої рогатої худоби за аналізом поліморфізму QTL-генів. Для розроблення методології ідентифікації генотипів тварин, асоційованих з поліпшеними характеристиками якості продукції, було досліджено генетичну структуру двох популяцій великої рогатої худоби української чорно-рябої молочної породи ($n=451$) за генами к-казеїну (*CSNK*), β -лактоглобуліну (*BLG*) та пролактину (*PRL*).

Як ДНК-мішені для ампліфікації фрагменту гена *CSNK* розміром 273 п.н. було обрано праймери, описані S. Kamiński et al. (1993). Продукт ампліфікації включав в себе ділянку IV інтрону та IV екзону гена *CSNK*, що давало змогу за допомогою ПЛР-ПДРФ-аналізу визначати алельні варіанти А і В. Для ампліфікації фрагменту гена *BLG* розміром 247 п.н. було обрано праймери, описані Medrano et al. (1990). Продукт ампліфікації включав у себе ділянку IV екзону гена *BLG*, що давало змогу визначати алельні варіанти А і В. Для ампліфікації фрагменту гена *PRL* розміром 294 п.н. було обрано праймери, описані Р. Вгум (2005). Продукт ампліфікації включав в себе ділянку IV екзону гена і давав змогу визначати алельні варіанти А і G.

Для локусу *CSNK* було виявлено три генотипи (рис. 2А). Генотип АА характеризувався продуктами рестрикції розміром 133, 91 і 49 п.н., генотип ВВ – фрагментами 224, 49 п.н., генотип АВ відповідно – 224, 133, 91 і 49 п.н. Локус *BLG* також характеризувався наявністю трьох генотипів – АА, АВ і ВВ. Гомозигота АА була представлена фрагментами розміром 148 і 99 п.н., гомозигота ВВ – фрагментами 99, 74 і 74 п.н. Гетерозиготний генотип АВ було представлено відповідно фрагментами 148, 2 x 99, 2 x 74 п.н. (рис. 2В). Стосовно *PRL*, за даним локусом також було виявлено три генотипи (рис. 2С). Генотип АА характеризувався продуктами рестрикції розміром 162 і 132 п.н., GG – 294 п.н. Генотип гетерозиготної тварини було представлено фрагментами 294, 162 і 132 п.н.

Аналіз генетичної структури двох популяцій української чорно-рябої породи великої рогатої худоби («Митниця», $n=251$; «Агрофірма Колос», $n=200$) виявив наявність високого рівня поліморфізму за всіма трьома дослідженими локусами. Для локусу *CSNK* було виявлено три генотипи – АА, АВ та ВВ. Переважаючим у двох популяціях виявився алельний варіант А, який зустрічався з частотами 0,894 та 0,903 (табл. 1). Частота алеля В становила 0,106 і 0,097, що є характерним для європейських комерційних порід ВРХ. Генотип ВВ було виявлено лише у одній тварині, яка утримувалася у господарстві «Митниця».

Стосовно *BLG* як у першій, так і в другій популяціях було виявлено три генотипи – АА, АВ і ВВ. Бажаний алельний варіант *BLG* В, який пов'язують з високим вмістом жиру та казеїнових білків у молоці, переважав у популяції великої рогатої худоби з «Митниці». Частота алеля *BLG* В у даній популяції становила 0,639, в той час як *BLG* А – 0,361. У стаді «Агрофірми Колос» навпаки, переважаючим був алель А з частотою 0,630 (табл. 1).

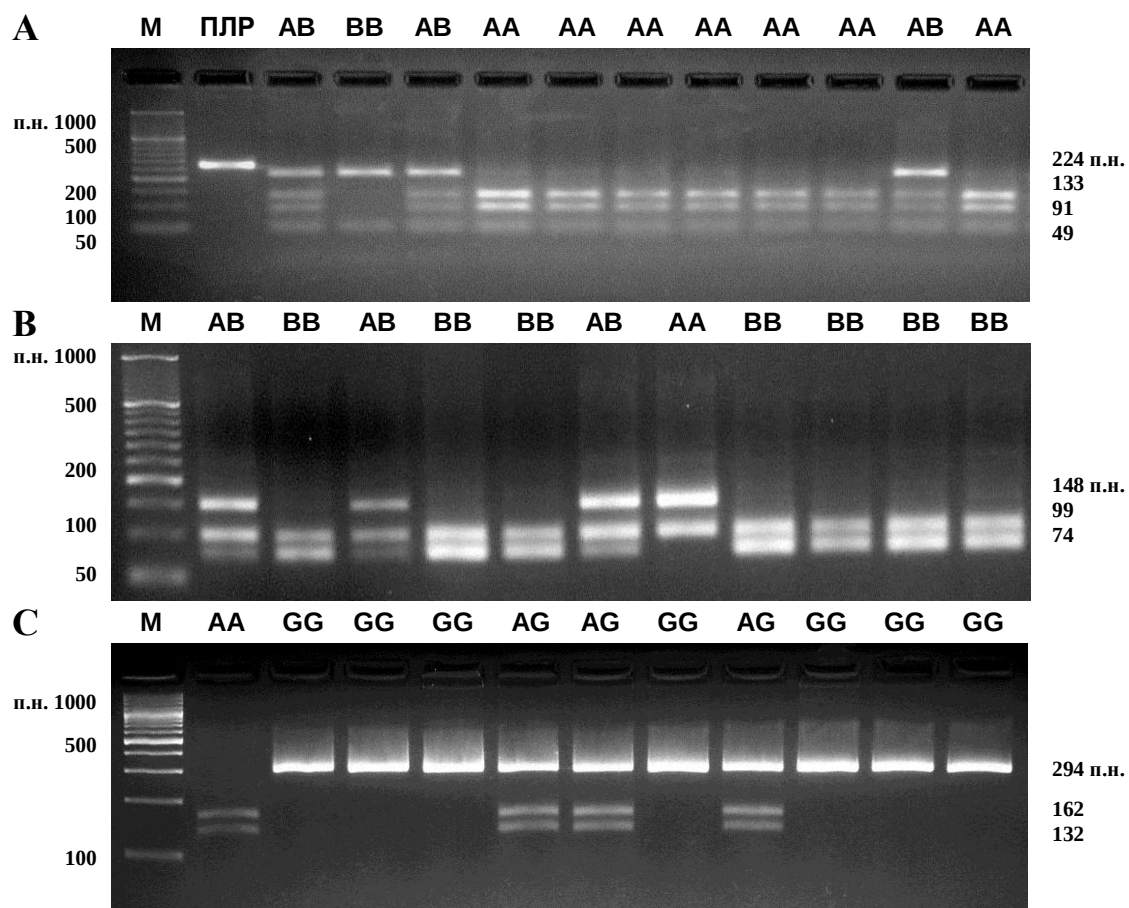


Рис. 2. ПЛР-ПДРФ-аналіз поліморфізму QTL-генів молочної продуктивності великої рогатої худоби: (А) ген *CSNK*; (В) ген *BLG*; (С) ген *PRL*. М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ 50bp DNA Ladder або 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Литва).

1. Розподіл частот алелів та генотипів за генами кількісних ознак у популяціях української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби

Локус	Алелі	Частоти алелів	Генотипи	Кількість тварин	Частоти генотипів
«Митниця» Київська обл., Васильківський р-н					
CSNK	A B	0,894 0,106	AA	199	0,793
			AB	51	0,203
			BB	1	0,004
BLG	A B	0,361 0,639	AA	31	0,124
			AB	119	0,474
			BB	101	0,402
PRL	A G	0,119 0,881	AA	0	0,000
			AG	60	0,239
			GG	191	0,761
«Агрофірма Колос» Київська обл., Сквирський р-н					
CSNK	A B	0,903 0,097	AA	161	0,807
			AB	39	0,193
			BB	0	0,000
BLG	A B	0,630 0,370	AA	86	0,430
			AB	80	0,400
			BB	34	0,170
PRL	A G	0,120 0,880	AA	3	0,017
			AG	42	0,211
			GG	155	0,772

Водночас частоти гетерозиготного генотипу АВ в обох популяціях практично збігалися – 0,474 та 0, 400. Локус пролактину також було представлено трьома генотипами – АА, АГ і ГГ. Однак слід зазначити, що тварини з генотипом АА були присутні лише в господарстві «Агрофірма Колос». Як у першій, так і в другій популяції великої рогатої худоби переважав господарсько-цінний алельний варіант PRL G з частотами 0,881 та 0,880 відповідно (табл. 1).

Вплив комбінацій генетичних варіантів CSNK, BLG та PRL на параметри молочної продуктивності та сиропридатність молока. Для встановлення взаємозв'язків між генетичною структурою досліджених популяцій великої рогатої худоби за обраними QTL та параметрами молочної продуктивності і технологічними властивостями молока було досліджено наступні показники – надій (кг), масова частка жиру і білка (%), тривалість сичужного зсідання молока (хв).

Серед дослідженого поголів'я популяції корів з господарства «Митниця» найвищою молочною продуктивністю характеризувалися тварини з генотипами BLG AA (4435 кг) та PRL AG (4216 кг) (табл. 2). Такі тварини становили 12,4 % (n=31) та 23,9 % (n=60) відповідно. Найменші надії було виявлено у тварин з генотипами CSNK AB (4029 кг) та BLG AB (4435 кг). Частоти зазначених генотипів становили відповідно 20,3 % (n=51) та 47,4 % (n=119). Генотип CSNK BB не брали до уваги, оскільки він був представлений лише однією твариною.

Стосовно жирності молока, найвищий % жиру в молоці мали корови з генотипом BLG AA (3,40 %). Частка таких тварин у стаді становила 12,4 % (n=31). За вмістом білка дещо переважали тварини з генотипами BLG BB (3,13 %) та PRL AG (3,14 %). Відсоток таких тварин у популяції становив 40,2 (n=101) та 23,9 (n=60) відповідно.

Генетичну структуру двох стад української чорно-рябої худоби було оцінено за трьома локусами одночасно (табл. 3).

Найвищу продуктивність (4413–5537 кг) спостерігали у корів з генотипами CSNK AA / BLG AA / PRL AG та CSNK AA / BLG AA / PRL GG. Високий рівень надойв (4557 кг) було також зафіксовано у корів з генотипом CSNK AB / BLG AA / PRL AG господарства «Митниця». Частоти цих генотипів становили 4,4, 5,6 та 1,6 % відповідно. Дещо більший відсоток тварин із зазначеними генотипами спостерігали в господарстві «Агрофірма Колос» – 15,5 та 21 % відповідно.

За показниками жирності молока у господарстві «Митниця» мали перевагу тварини з генотипами CSNK AA / BLG AA / PRL AG (3,47%), CSNKAA / BLGAA / PRLGG (3,48%) та CSNKAA / BLGAB / PRLGG (3,45%). Частка таких генотипів у стаді становила 4,4, 5,6 та 7,2 % відповідно. У другому господарстві статистично значущих відмінностей між групами тварин з різними комплексними генотипами виявлено не було.

Щодо вмісту білка в молоці, переважали тварини з генотипами CSNK AB / BLG AA / PRL AG (3,26 %) та CSNK AB / BLG BB / PRL AG (3,27 %), які утримувалися в господарстві «Митниця». Їх частка в стаді становила 0,8 та 2,0 % відповідно. Статистично значущих відмінностей за даним показником у корів господарства «Агрофірма Колос» виявлено не було.

2. Показники молочної продуктивності популяції корів української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби господарства «Митниця» за різними генотипами локусів CSNK, BLG та PRL ($\bar{X} \pm m_x$)

Показник	Генотипи за локусом <i>CSNK</i>			Генотипи за локусом <i>BLG</i>			Генотипи за локусом <i>PRL</i>		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AG	GG
Надій, кг	4164± 92,0	4029± 182,0	2010± 0,0	4435± 227,0	4050± 124,0	4126± 125,0	-	4216± 165,0	4100± 94,8
Жир, %	3,32± 0,050	3,17± 0,090	2,72± 0,000	3,40± 0,010	3,32± 0,070	3,21± 0,060	-	3,21± 0,090	3,31± 0,050
Білок, %	3,09± 0,020	3,10± 0,050	3,48± 0,000	3,04± 0,050	3,08± 0,030	3,13± 0,030	-	3,14± 0,040	3,08± 0,020

3. Порівняльна характеристика показників молочної продуктивності популяцій корів господарств «Митниця» та «Агрофірма Колос» з різними комплексами генотипів за локусами CSNK, BLG та PRL ($\bar{X} \pm m_x$)

Показник	Комплекси генотипів за локусами <i>CSNK</i> / <i>BLG</i> / <i>PRL</i>											
	AA/AA/AG	AA/AA/GG	AA/AB/AG	AA/AB/GG	AA/BB/AG	AA/BB/GG	AB/AA/AG	AB/AA/GG	AB/AB/AG	AB/AB/GG	AB/BB/AG	AB/BB/GG
«Митниця» Київська обл., Васильківський р-н.												
Надій, кг	4413± 1471,4	4460± 1135,2	3969± 1230,1	4047± 1310,5	4214± 1327,7	4255± 1322,1	4557± 1108,3	4144± 2327,1	4300± 1576,5	4076± 1724,9	4319± 1150,3	3736± 882,3
Жир, %	3,47± 0,537	3,48± 0,577	3,45± 0,531	3,36± 0,760	2,98± 0,736	3,25± 0,527	3,12± 0,417	3,28± 0,021	2,82± 0,132	3,13± 0,735	2,98± 0,234	3,35± 0,607
Білок, %	3,07± 0,262	2,99± 0,182	3,09± 0,220	3,09± 0,294	3,16± 0,300	3,08± 0,242	3,26± 0,383	3,10± 0,891	2,82± 1,198	3,07± 0,269	3,27± 0,416	3,12± 0,274
«Агрофірма Колос» Київська обл., Сквирський р-н.												
Надій, кг	5537± 129,6	5511± 117,7	5492± 195,6	5467± 217,8	-	5425± 260,7	-	5460± 226,3	-	5415± 148,64	-	5374± 248,6
Жир, %	3,84± 0,067	3,85± 0,054	3,84± 0,067	3,86± 0,088	-	3,88± 0,064	-	3,87± 0,061	-	3,88± 0,085	-	3,63± 0,087
Білок, %	3,10± 0,036	3,10± 0,033	3,09± 0,034	3,09± 0,062	-	3,08± 0,022	-	3,15± 0,047	-	3,14± 0,026	-	3,13± 0,026

* Генотипи, що не ввійшли до таблиці: «Митниця» BB/BB/GG - 2010±0,0; 2,72±0,0; 3,48±0,0 (1 тварина); «Агрофірма Колос» AA/AA/AA - 5630±213,6; 3,83±0,078; 3,11±0,059 (3 тварини).

Матеріалом для досліджень сиропридатності слугували зразки молока корів української чорно-рябої породи господарства «Агрофірма Колос». З огляду на те, що в цьому стаді виявлено 9 комплексних генотипів за генами *CSNK*, *BLG* і *PRL*, було відібрано 9 різних проб молока. Зразки молока відбирали від тварин, які перебували на 5–6 місяці лактації, об'ємом 3000 мл кожен.

Аналіз отриманих даних показав, що сиропридатність молока дещо відрізняється у корів з різними комплексними генотипами *CSNK* / *BLG* / *PRL* (табл. 4). Найкращі показники тривалості сичужного зсідання молока були притаманні тваринам з комплексними генотипами *CSNK* AB / *BLG* BB / *PRL* GG та *CSNK* AB / *BLG* AB / *PRL* GG і становили 26,1 та 26,9 хв відповідно. За тривалістю сичужного зсідання молока від мінімальної до максимальної комплексні генотипи *CSNK* / *BLG* / *PRL* можна розташувати у такій послідовності: AB/BB/GG → AB/AB/GG → AB/AA/GG → AA/AB/GG → AA/AB/AG → AA/AA/GG → AA/BB/GG → AA/AA/AA → AA/AA/AG. Із наведеної послідовності видно, що найбільш сприятливі для сироваріння властивості молока у дослідженої популяції ВРХ визначає експресія алельних варіантів *CSNK* B і *BLG* B та меншою мірою *PRL* G.

4. Зв'язок комплексних генотипів *CSNK* / *BLG* / *PRL* з тривалістю сичужного зсідання молока

№	Комплексний генотип <i>CSNK</i> / <i>BLG</i> / <i>PRL</i>	Тривалість сичужного зсідання молока, хв
1	AA / AA / AA	31,8
2	AA / AA / AG	32,2
3	AA / AA / GG	30,5
4	AA / AB / AG	29,7
5	AA / AB / GG	27,8
6	AA / BB / GG	30,8
7	AB / AA / GG	27,7
8	AB / AB / GG	26,9
9	AB / BB / GG	26,1

Оцінювання інформативності молекулярно-генетичних маркерів для визначення вірусу лейкозу ВРХ. Для вдосконалення методології ідентифікації небезпечних чинників у харчовій продукції тваринного походження було проведено порівняльну діагностику поголів'я великої рогатої худоби на присутність провірусної ДНК ВЛ ВРХ за допомогою технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі. Як молекулярно-генетичні маркери для визначення ВЛ ВРХ зазвичай використовують послідовності вірусних генів *Env*, *Gag* і *Pol* (Christopher, 2003). На основі аналізу літературних джерел та нуклеотидних послідовностей вірусних генів, представлених в інтернет-базі даних сервера NCBI, було обрано консервативну ділянку гена *Env*, який кодує поверхневий вірусний глікопротеїд gp51. Праймери з зондом для проведення ПЛР у реальному часі розроблено в Українській лабораторії якості та безпеки продукції АПК НУБіП (Новак, 2008). Крім того, було підібрано другу пару праймерів з зондом до гена пріонового білка (PRNP) великої рогатої худоби, котру використали як внутрішній ендогенний

контроль якості виділеної ДНК та перебігу ПЛР-РЧ. Зонд для визначення гена *Env* ВЛ ВРХ було мічено флуоресційним барвником FAM та гасником флуоресценції BHQ1, для *PRNP* – JOE та BHQ1. Теоретичну специфічність олігонуклеотидних праймерів і зондів було перевірено за використання алгоритму *BLAST* серверу NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Вона становила 100 %.

Оптимізацію умов ампліфікації у форматі мультиплексу здійснювали за температурою гібридизації (T_a) праймерів, концентрацією праймерів і зондів, а також концентрацією $MgCl_2$. Експериментально встановлено, що оптимальна T_a праймерів знаходилася в межах від 58 до 62°C, найкращі результати було отримано за концентраціями 5 пкМ для праймерів, 2.5 пкМ для зондів, 3 мМ для $MgCl_2$. Межа чутливості тест-системи – 10 копій ДНК-мішені.

Ефективність мультиплексної ПЛР-РЧ системи перевіряли тестуванням поголів'я української чорно-рябої молочної худоби агростанції «Митниця» ($n=251$). Усіх тварини попередньо було протестовано на присутність BLV за допомогою РІД-аналізу. Повторний аналіз 6 РІД-позитивних тварин за допомогою технології *TaqMan*® ПЛР-РЧ підтвердив попередній діагноз. Перевірка 245 РІД-негативних тварин дала змогу додатково виявити ще 11 носіїв вірусу, а загальна кількість інфікованих тварин зросла до 17 голів (табл. 5). Отже, інфікованість дослідженого поголів'я ВРХ після додаткової перевірки методом ПЛР-РЧ зросла з 2,4 до 6,8 %.

5. Порівняльний аналіз визначення тварин, інфікованих ВЛ ВРХ

Кількість тварин	РІД		ПЛР-РЧ	
	(-)	(+)	(-)	(+)
251	245	6	234	17

Визначення ВЛ ВРХ у коров'ячому молоці методом ПЛР у реальному часі. Для визначення збудника лейкозу великої рогатої худоби у молоці від тварин, попередньо протестованих на інфікованість ВЛ ВРХ методом імуноферментного аналізу (ІФА), відбирали зразки молока об'ємом 50 мл. Порівняльні випробування трьох загальноприйнятих методів екстракції ДНК (СТАБ-преципітація, фенольно-хлороформна екстракція, сорбція на силікагелі) дали змогу обрати найбільш оптимальний. Найбільшу кількість ДНК (40–80 нг/мкл) за її задовільної якості (λ 260/280=1,8–2,0) вдалось отримати у разі використання методу сорбції на силікагелі з власними модифікаціями.

Для порівняльного оцінювання використання молока як альтернативного діагностичного матеріалу паралельно було проведено ПЛР-РЧ-аналіз ДНК, виділеної зі зразків крові від тих самих особин. Пробу розглядали як позитивну на присутність ВЛ ВРХ лише в тому випадку, коли сигнал флуоресценції детектувався за двома каналами (FAM і HEX), а значення C_t варіювало з 15 по 40 цикл. Відповідно, пробу розглядали як негативну, якщо сигнал детектувався лише за каналом HEX (ендогенний контроль). Зразки від ІФА-позитивних тварин дали позитивний ПЛР-сигнал, ІФА-негативний зразок дав негативний сигнал. Значення граничного циклу C_t за каналом FAM були в межах від $36,14 \pm 0,036$ до $41,75 \pm 1,315$ за каналом HEX – від $25,18 \pm 0,237$ до $27,85 \pm 0,083$ (рис. 3). Відтак, різниця значень C_t

між зразками крові та молока за каналом FAM становила приблизно 10 циклів. Такі розбіжності в значеннях є цілком закономірними з огляду на кількісне співвідношення соматичних клітин у крові та молоці. З огляду на це, для зменшення ймовірності виникнення хибно-негативних сигналів у випадку низької концентрації вірусу рекомендовано збагачувати досліджувані зразки молока соматичними клітинами, наприклад за рахунок збільшення об'єму дослідного матеріалу.

Результати проведених досліджень довели ефективність застосування методу ПЛР-РЧ як у комплексі протилейкозних заходів у господарствах, так і безпосередньо під час контролю безпечності продукції.

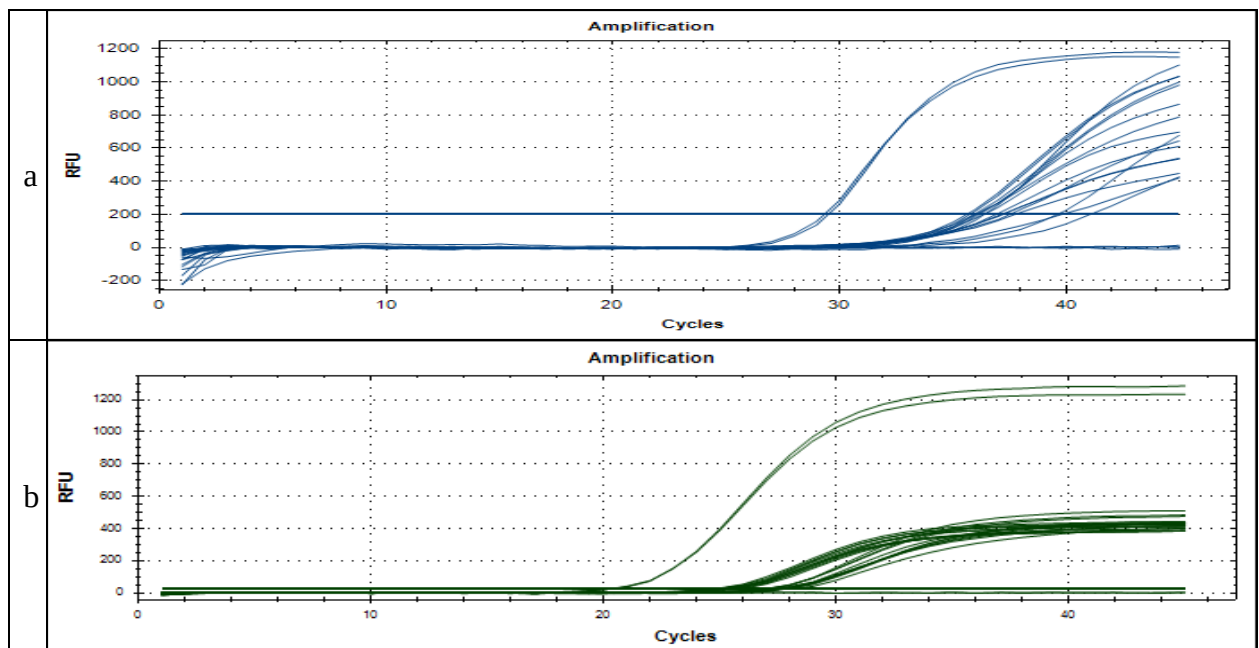


Рис. 3. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ: а – провірусна ДНК (канал FAM) ; б – внутрішній ендогенний контроль (канал HEX).

Якісне та кількісне оцінювання вмісту молочнокислих бактерій, біфідобактерій та ентерококів у молочних продуктах. Запропоновано методику визначення корисної мікрофлори у складі молочної продукції на основі технології SYBR®Green методу ПЛР-РЧ та доведено можливість ідентифікації групи молочнокислих бактерій та біфідобактерій у готовій молочній продукції під час контролю складу молочної мікрофлори, а також під час створення нових заквасок, пробіотиків та пробіотичних продуктів. Як молекулярно-генетичні маркери для визначення молочнокислих бактерій, біфідобактерій та ентерококів було обрано відповідні ділянки генів *16S rRNA* та фактору елонгації *Tu*. Розроблений підхід є досить чутливим і точним, не вимагає наявності специфічних зондів і додаткової адаптації протоколу «класичної» ПЛР. Праймери, обрані для детекції представників *Bifidobacterium* (Kok, 1996), уможливлювали ампліфікацію фрагменту розміром 523 п.н., для детекції *Lactobacillus* (Dubernet, 2002) – фрагмент 209 п.н. і для *Enterococcus* (Ke, 1999) – 112 п.н. Перевірку роботи праймерів здійснювали шляхом ампліфікації ДНК типових штамів *Bifidobacterium longum* CCM 4990, *Lactobacillus casei* CCM 7088, *Enterococcus faecalis* CCM 7000.

Результати первинного оцінювання роботи праймерів за двома досліджуваними показниками (C_t , ΔR_n) продемонстрували, що вони можуть бути використані для ідентифікації бактерій, які належать до родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і *Enterococcus* у форматі технології SYBR®Green методу ПЛР у реальному часі. Оцінювання ефективності роботи 3 пар праймерів показало, що значення кутів нахилу α вкладалися в діапазон від -2,5 до -4,5, показники R^2 були $\geq 0,98$, а значення ефективності ПЛР для *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus* становили 80,8, 67,2 та 70,0 % відповідно. Оцінювання специфічності технології SYBR®Green здійснювали за допомогою постампліфікаційного аналізу кривих плавлення (рис. 4). Наявність чітко вираженого піку кривої плавлення, який відповідає єдиній смугі на електрофореграмі, свідчить про специфічність використаних праймерів для ідентифікації бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus*. Діапазон значень температур плавлення продуктів ампліфікації становив 85–86 °C для *Bifidobacterium*, 80,5–81,5 °C для *Lactobacillus* та 78–79 °C для *Enterococcus*.

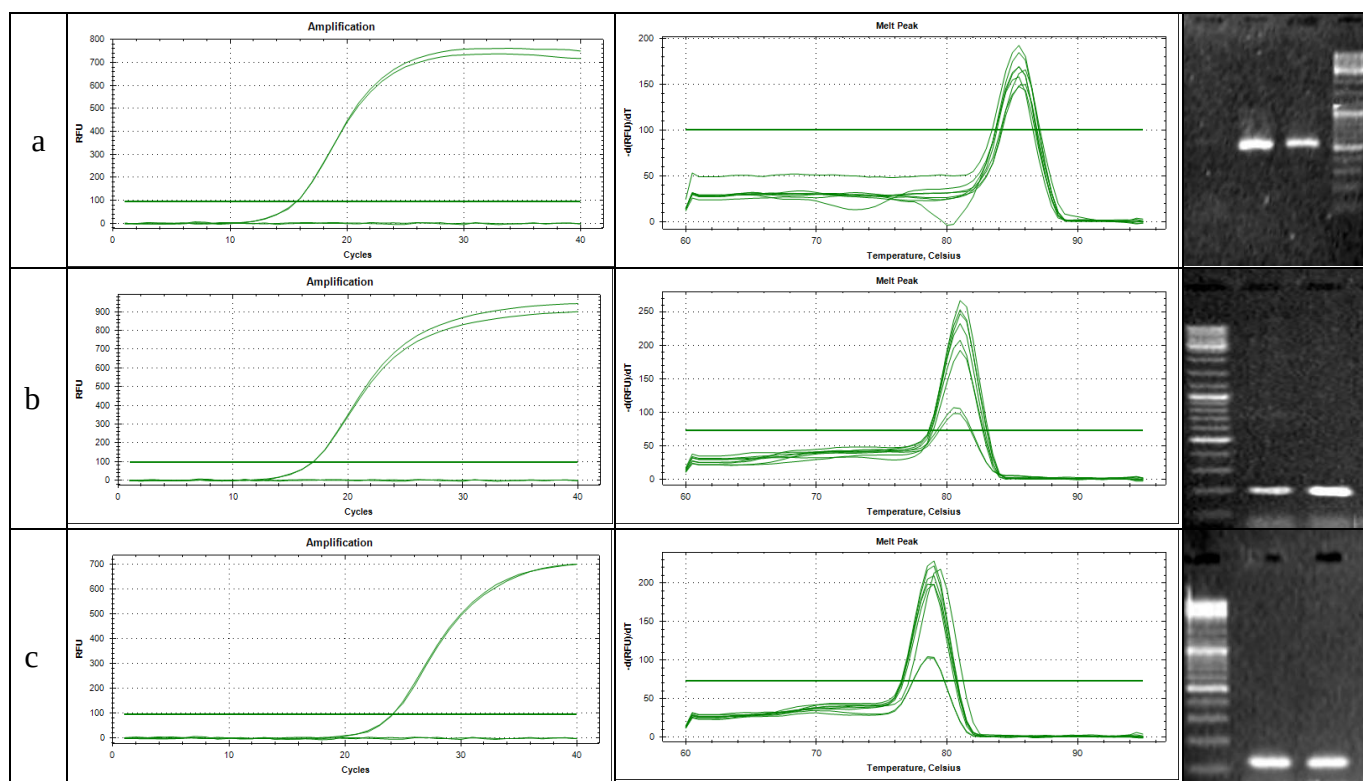


Рис. 4. Порівняння графіків накопичення флуоресційного сигналу та постампліфікаційного аналізу кривих плавлення за технологією SYBR®Green ПЛР-РЧ з електрофореграмою продуктів ампліфікації у 1,7 % агарозному гелі: a – *Bifidobacterium*; b – *Lactobacillus*; c – *Enterococcus*.

Для проведення кількісного аналізу корисної мікрофлори у молочній продукції було приготовлено стандартні зразки шляхом десятикратних розведень ДНК *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus*. Кожна серія розведень складалася з 4 точок з концентраціями ДНК від 0,25 до 250 нг/мкл. ПЛР-ампліфікацію стандартів проводили разом з досліджуваними зразками молочної

продукції. На основі отриманих значень C_t стандартів будувалися стандартні криві, за якими визначали початкову кількість ДНК досліджуваних зразків, внесenu в реакційну суміш. Всього було досліджено 4 види молочної продукції: коров'яче молоко, йогурт, сметана та м'який кисломолочний сир. Вміст біфідобактерій у зразках молока, сметани та сиру був незначним і практично однаковим, що може свідчити про їх випадкове потрапляння у молочні продукти. Водночас у зразках йогурту їх кількість сягала 10^5 ГЕ/мл. Крім того, спостерігали збільшення кількості лактобацил та ентерококів у сметані та сирові порівняно з їхньою кількістю у молоці. Найбільша кількість лактобацил (10^8 ГЕ/мл) була присутня у зразках йогурту.

6. Кількісне визначення бактеріальної ДНК у кисломолочних продуктах

№	Рід бактерій	Досліджені зразки, ГЕ/мл (мг)			
		Молоко	Сметана	Йогурт	Сир
1	<i>Bifidobacterium</i>	$0,04 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,03$	$(0,6 \pm 0,02) \times 10^5$	$0,19 \pm 0,02$
2	<i>Lactobacillus</i>	$(2,0 \pm 0,09) \times 10^3$	$(1,9 \pm 0,10) \times 10^5$	$(1,1 \pm 0,07) \times 10^8$	$(9,4 \pm 0,04) \times 10^5$
3	<i>Enterococcus</i>	$(1,7 \pm 0,08) \times 10^6$	$(2,3 \pm 0,06) \times 10^7$	-	$(2,7 \pm 0,17) \times 10^7$

Таким чином, застосування технології SYBR[®]Green ПЛР-РЧ дає змогу чітко ідентифікувати групи молочнокислих і біфідобактерій у молочній продукції, повністю виключає ризик появи хибно-позитивних результатів за рахунок відсутності постапліфікаційних маніпуляцій та істотно скорочує тривалість і зменшує трудомісткість визначення корисної мікрофлори молочної продукції.

ВИЗНАЧЕННЯ ВИДОВОЇ НАЛЕЖНОСТІ М'ЯСА У СКЛАДІ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ СИРОВИНИ І ХАРЧОВОЇ ПРОДУКЦІ

Підбір молекулярних-генетичних маркерів та оптимізація умов проведення ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу. Розроблено методику визначення фальсифікації видової належності м'яса курятини, свинини та яловичини методом ПЛР-РЧ у харчовій продукції та кормах для тварин. Як молекулярно-генетичні маркери визначення видової належності тваринних тканин було обрано послідовності генів цитохрому b (*cytb*) курки та свині, а також сателітної IV ДНК ВРХ (1.709 satellite IV DNA family). Нуклеотидні послідовності маркерних генів для всіх трьох видів тварин представлено в інтернет-базі даних GenBank[®] серверу NCBI: AY235571 (*Gallus gallus*), X56295 (*Sus scrofa*) та AF446392 (*Bos taurus*). Праймери з зондами підібрано К. Jonker (2008) за використання програмного забезпечення Primer Express[®] (Applied Biosystems, США). TaqMan-зонди для визначення генів *cytb* курки і свині, а також сателітної ДНК ВРХ було мічено флуоресційними барвниками FAM, HEX і ROX відповідно. Кожному флуоресційному барвнику відповідав належний йому гасник флуоресценції – BHQ1-2.

Оптимізацію умов ампліфікації праймерів з зондами у форматі мультиплексу проводили за такими параметрами як температура гібридизації (T_a) праймерів, концентрація та співвідношення праймерів і зондів, концентрація $MgCl_2$.

Оцінювання роботи праймерів здійснювали за такими критеріями як величина граничного циклу (Ct) та рівень репортерної флуоресценції (ΔRn). Для параметру Ta праймерів найкращі результати було отримано при 68 °C. За такої температури за кожним із каналів флуоресценції спостерігали лише специфічний сигнал: FAM/курятини (Ct=13,24, $\Delta Rn=500rfu$); HEX/свинини (Ct=16,98, $\Delta Rn=300rfu$), ROX/яловичини (Ct=8,47, $\Delta Rn=550rfu$). Найбільш оптимальна концентрація $MgCl_2$ для проведення ПЛР мультиплексної системи з трьома парами праймерів становила 5 мМ: FAM/курятини (Ct=10,64, $\Delta Rn=1175rfu$); HEX/свинини (Ct=11,79, $\Delta Rn=1075rfu$), ROX/яловичини (Ct=6,93, $\Delta Rn=1300rfu$). Експериментально встановлено, що для найбільш пріоритетного показника Ct найкращі результати перебігу ПЛР-РЧ було отримано за концентраціями 5 пкМ для праймерів та 2.5 пкМ для зондів: FAM/курятини (Ct=12,76); HEX/свинини (Ct=13,18), ROX/яловичини (Ct=7,94).

Оцінювання валідаційних характеристик (специфічність, ефективність, чутливість) тест-системи «М'ясо-тест» на основі технології TaqMan® ПЛР-РЧ. Перевірку специфічності роботи праймерів та зондів у форматі мультиплексу здійснювали шляхом тестування зразків ДНК, ізольованої з наступних організмів: курка (*Gallus gallus*), свиня (*Sus domesticus*), корова (*Bos taurus*), вівця (*Ovis aries*), індик (*Meleagris gallopavo*), качка (*Anas platyrhynchos*), гуска (*Anser domesticus*), кінь (*Equus caballus*), лосось (*Salmo salar*), людина (*Homo sapiens*), соя (*Glycine max*), кукурудза (*Zea mays*), ріпак (*Brassica napus*), рис (*Oryza sativa*), жито (*Secale cereal*), пшениця (*Triticum aestivum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), овес (*Avena sativa*), гречка (*Fagopyrum esculentum*), томати (*Lycopersicon esculentum*), картопля (*Solanum tuberosum*), кишкова паличка (*Escherichia coli*). Перехресних реакцій при цьому виявлено не було. Результати досліджень підтвердили 100 % специфічність всіх трьох обраних пар праймерів.

Ефективність роботи праймерів з зондами у форматі мультиплексу перевіряли шляхом проведення ПЛР-РЧ з серією десятикратних розведень препаратів ДНК. Отримані дані продемонстрували, що для всіх пар праймерів значення кутів нахилу α вкладалися в діапазон від -3,58 до -3,10, а показники R^2 були не нижчими за 0,99. Розраховані значення ефективності ПЛР для каналів FAM, HEX і ROX становили 103,2, 100,0 і 94,9 % відповідно, що є досить високим показником для діагностичних тест-систем (рис. 5).

Визначення аналітичної чутливості тест-системи проводили за допомогою кількісно охарактеризованих препаратів ДНК, екстрагованих із м'яса курки, свині та корови. Якісний та кількісний склад ДНК перевіряли спектрофотометрично за допомогою приладу BioPhotometer® (Eppendorf, Німеччина). Для подальшої роботи відбирали лише ті зразки ДНК, в яких значення показників $A_{260/280}$ та $A_{260/230}$ лежали в межах 1,8–2,0 та 1,5–2,0 відповідно. Для всіх досліджуваних препаратів ДНК було приготовлено серію десятикратних розведень. Кожна серія нараховувала від 11 до 12 точок, які лежали в діапазоні від $n \times 10^2$ до $n \times 10^{-9}$ нг ДНК. Кожну точку аналізували у 10 повторностях.

На підставі отриманих даних (наявність-відсутність сигналу) було встановлено, що розроблена діагностична тест-система «М'ясо-тест» дає змогу ідентифікувати

ДНК курки, свині та корови з межею виявлення не менш ніж 1×10^{-6} нг (1фг). Специфічність розробленої тест-системи становить 100 %, аналітична чутливість – 1×10^{-5} нг (0,1нг/мл). Тест-систему характеризує високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів аналізу.

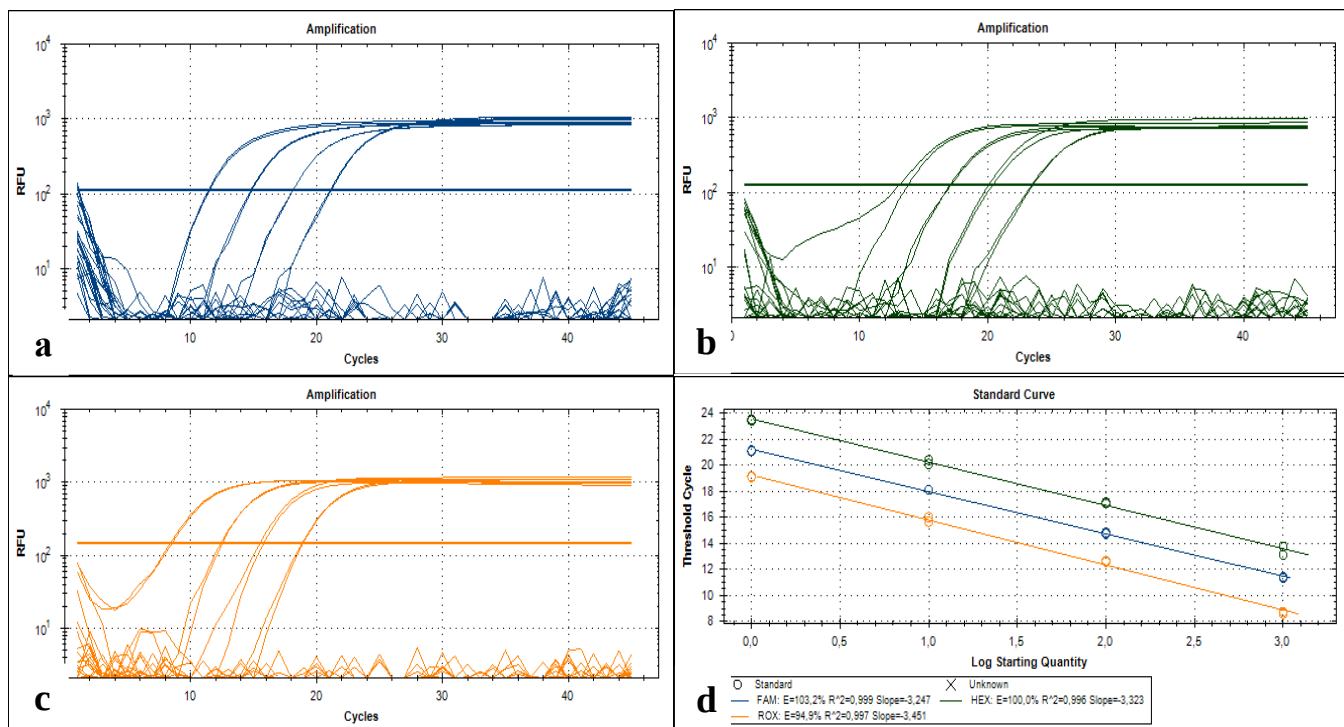


Рис. 5. Оцінювання ефективності роботи мультиплексної реакції: а–с – графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналами Fam/Hex/Rox, відповідно; d – стандартні криві, побудовані за результатами серій десятикратних розведень ДНК.

Для оцінювання можливості використання розробленої тест-системи для визначення видового складу м'ясної сировини у харчовій продукції та кормах було проведено серію досліджень. Як дослідні зразки було використано корми для тварин, м'ясні консерви, напівфабрикати та готові до споживання харчові продукти з вмістом м'яса загальною кількістю 33 найменування.

Для порівняння чутливості та специфічності роботи тест-системи проводили паралельні дослідження за використання тест-системи «Sus scrofa Ident RT» (Синтол, РФ), призначеної для ідентифікації свинини у харчовій продукції. Отримані дані щодо порівняльних випробувань тест-системи «М'ясо-тест» на основі технології *TaqMan*[®] методу ПЛР-РЧ засвідчують, що даний діагностикум є сучасним, високочутливим та специфічним і може бути рекомендований для проведення досліджень з визначення видової належності м'яса та м'ясних компонентів у харчовій продукції, в тому числі тій, що піддавалась термічній обробці, та у кормах для тварин.

РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДОЛОГІЇ ТА ПІДБІР МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГМР У СІЛЬСЬКО-ГОСПОДАРСЬКІЙ СИРОВИНІ, КОРМАХ ТА ХАРЧОВІЙ ПРОДУКЦІЇ МЕТОДОМ ПЛР-РЧ

Методологія визначення ГМО з застосуванням молекулярно-генетичних методів дослідження. Розроблено та запропоновано до використання методологію з визначення генетично модифікованих рослин (ГМР, ГМО) методом ПЛР-РЧ з врахуванням типу сільськогосподарських культур, що вирощуються в Україні. Згідно з даною методологією, дослідження зразків сільськогосподарської сировини та харчової продукції має проходити чотири основні етапи – якісний (скринінговий) аналіз, ідентифікацію ГМ ліній, видову ідентифікацію рослини та кількісний аналіз.

Для розроблення необхідної панелі ПЛР-РЧ тест-систем було визначено низку молекулярно-генетичних маркерів до різних елементів генно-інженерних конструктів, які було використано під час створення трансгенних сільськогосподарських культур. ДНК-мішенями для підбору олігонуклеотидних праймерів і зондів слугували як регуляторні елементи (P-35S, T-nos) генно-інженерних конструктів, так і гени «нових ознак» – 5-енолпірувілшикимат-3-фосфат синтаза (epsps) із *Agrobacterium tumefaciens* штаму CP4, фосфінотрицин N-ацетилтрасфераза із *Streptomyces viridochromogenes* (pat), фосфінотрицин N-ацетилтрасфераза із *Streptomyces hygroscopicus* (bar).

Для видової ідентифікації сільськогосподарських культур було обрано гени лектину сої (*lec*), алкогольдегідрогенази кукурудзи (*adh1*), круцеферину ріпаку (*cru*), глутамінсинтази цукрового буряку (*gs*) та фосфоліпази Д рису (*pld*). Для визначення ГМ ліній обирались праймери, локалізовані як у послідовність ДНК вбудованої генно-інженерної конструкції, так і в ДНК самої рослини.

Підбір олігонуклеотидних праймерів і зондів для ПЛР-РЧ та оцінювання продуктивності їх роботи. В основу розроблення серії тест-систем для визначення ГМО було покладено технологію *TaqMan*[®] методу ПЛР-РЧ. Сьогодні технологію *TaqMan*[®] вважають золотим стандартом кількісної ДНК/РНК-діагностики завдяки її продуктивності та якості. Застосування внутрішнього флуоресцентно-міченого зонду дало змогу суттєво збільшити специфічність методу, підвищити його чутливість та розширити динамічний діапазон. Крім того, ця технологія уможливорює створення мультиплексних систем з можливістю детектування двох та більше мішеней в одній реакційній суміші.

Для розроблення універсальних праймерів і зондів було проведено аналіз нуклеотидних послідовностей, представлених у інтернет-базі даних *GenBank*[®] серверу NCBI. Аналіз варіабельності нуклеотидних послідовностей і пошук консервативних ділянок, необхідних для підбору специфічних олігонуклеотидів, проводили за допомогою програмного забезпечення *Vector NTI Advance*[™] 9.1.0 (Invitrogen, США). Підбір праймерів з зондами для проведення ПЛР-РЧ здійснювали за допомогою комп'ютерної програми *Primer Express*[®] 3.0 (Applied Biosystems, США). Специфічність обраних олігонуклеотидів вивчали за допомогою алгоритму *Blast* серверу NCBI. Частина праймерів було залучено з літературних джерел та бази даних Інституту здоров'я та захисту споживачів Центру об'єднаних досліджень

Європейського союзу (IHCP, JRC). Загальна кількість обраних пар праймерів з зондами становила 61. *TaqMan*-зонди для проведення ПЛР-РЧ були мічені флуоресційними барвниками FAM, HEX, ROX, Cy5 та гасниками флуоресценції BHQ1-3 або RTQ1-3.

Перевірку роботи олігонуклеотидів здійснювали в декілька етапів. На першому етапі аналізували роботу кожної з підібраних пар праймерів з зондом окремо. Потім перевіряли можливість їхньої роботи в мультиплексній реакції. І, нарешті, оптимізували умови ампліфікації для кожного з утворених мультиплексів. Для проведення ПЛР було використано «класичний» температурний профіль ампліфікації, який складається з трьох температурних інтервалів. Первинне оцінювання роботи праймерів здійснювали за величинами граничного циклу (C_t) та значеннями рівня репортерної флуоресценції (ΔR_n).

Перевірку специфічності роботи праймерів здійснювали за допомогою зразків ДНК, ізольованих із сертифікованого референтного матеріалу (IRMM, EC). Крім того, було використано зразки ДНК традиційних сільськогосподарських культур.

Ефективність роботи праймерів і зондів перевіряли шляхом проведення ПЛР-РЧ із серією десятикратних розведень ДНК стандартних зразків. Для кожної пари праймерів з зондом за допомогою методу найменших квадратів було обчислено кут нахилу кінетичної кривої (α , Slope), коефіцієнт кореляції (R^2) та ефективність реакції (E). Для всіх досліджених пар олігонуклеотидів значення кутів нахилу α вкладалися в діапазон від -2,5 до -4,5, а показники R^2 були не нижчими за 0,98. Обчислені значення ефективності ПЛР становили від 77,1 до 113,6 %. На основі отриманих результатів було відібрано праймери з найкращими характеристиками.

Оптимізація умов ПЛР-РЧ у форматі мультиплексу. Оптимізацію роботи мультиплексів проводили за такими параметрами як температура гібридизації (T_a) праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Було застосовано двостадійний протокол ПЛР-РЧ. Найкращими вважали результати, за якими спостерігалось найменше значення C_t та найбільше значення ΔR_n .

Оптимізацію за T_a праймерів проводили в діапазоні температурних значень 50–65°C, з інтервалом в 5°C. Оптимізацію реакції за різною концентрацією $MgCl_2$ проводили в діапазонах 1; 1,5; 2; 2,5; 3 і 4 мМ. Для оптимізації за концентрацією праймерів і зондів було обрано чотири точки – 2,5; 5, 10 і 20 пкмоль/реакцію, для визначення величини їх співвідношення ще три точки – 2,5; 5 та 7,5 пкмоль/реакцію зонду. Проведена серія досліджень з оптимізації ПЛР-РЧ у форматі мультиплексів дала змогу підібрати оптимальні параметри: $T_a=60^\circ C$; $MgCl_2=3$ мМ; концентрація праймерів 10 пкМ, зондів – 5 пкМ, за співвідношення 2 : 1.

Ефективність перебігу ПЛР-РЧ у форматі мультиплексів перевіряли методом побудови стандартних кривих. Отримані дані продемонстрували, що обрані праймери дають змогу детектувати ДНК-мішені з ефективністю від 80 до 109 %. Значення коефіцієнтів R^2 , за невеликим винятком, дорівнювали 0,99. Коефіцієнти нахилу калібрувальних кривих знаходилися в діапазоні від -3,139 до -3,917 (рис. 6).

Визначення аналітичної чутливості розроблених тест-систем проводили за використання десятикратних розведень зразків ДНК. Отримані результати

продемонстрували, що межа чутливості розроблених тест-систем коливається в межах від $n \times 10^1$ до $n \times 10^2$ ГЕ/мл.

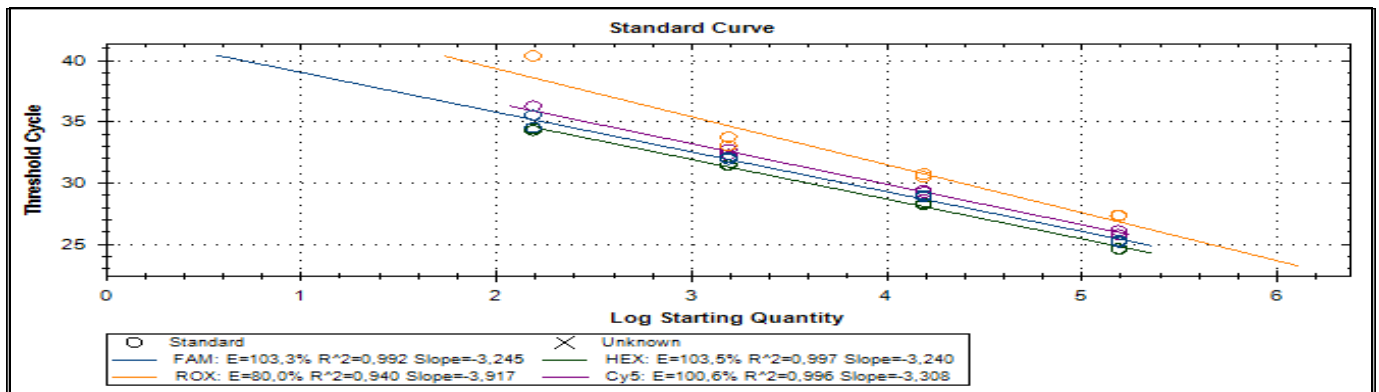


Рис. 6. Графіки стандартних кривих серії десятикратних розведень стандартних зразків, побудовані за результатами ПЛР-РЧ.

Розроблення тест-систем «ГМО скринінг», «ГМО ідентифікація», «ГМО кількість». На підставі проведених досліджень було розроблено серію тест-систем «ГМО скринінг», «ГМО ідентифікація» і «ГМО кількість» загальною кількістю 51 найменування, яка дає змогу ідентифікувати генно-модифікований складник у сільськогосподарській сировині, кормах для тварин та харчовій продукції. Серія «ГМО скринінг» складається з 5 діагностикумів для визначення ГМО сої, кукурудзи та ріпаку за регуляторними елементами та генами «нової ознаки». Крім того, було розроблено універсальну тест-систему «ГМ рослина» для визначення ГМО в багатокомпонентних зразках з невідомим складом. Розроблені діагностикуми характеризуються 100% специфічністю з межею детектування не менш ніж 0,01 %.

Серія «ГМО ідентифікація» уможливорює ідентифікацію 5 ліній ГМ сої, 14 ліній ГМ кукурудзи, 8 ліній ГМ ріпаку, по одній лінії ГМ рису та цукрового буряку, 8 традиційних сільськогосподарських культур, вірусу CaMV та бактерії *Agrobacterium tumefaciens*. Тест-системи характеризуються 100% специфічністю, високим рівнем аналітичної чутливості, повторюваністю та відтворюваністю результатів. Серія «ГМО кількість» уможливорює визначення кількісного вмісту ГМ сої та кукурудзи за промотором 35S CaMV і термінатором NOS *A. tumefaciens*, 1 лінії ГМ сої і 9 ліній ГМ кукурудзи за трансформаційними подіями. Тест-системи характеризуються 100% специфічністю з межею кількісного визначення не менш ніж 0,1 %.

За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи на виробництво серії тест-систем отримано ТУ У 24.6-02568182-001:2011, ТУ У 20.1-40719638-001:2019, патент на корисну модель № 72083.

Упродовж 2007–2017 рр. за використання розроблених тест-систем здійснено контроль за обігом ГМО в країні шляхом перевірки сільськогосподарської сировини і харчової продукції. Аналіз показав, що за останню декаду вміст ГМО у сільськогосподарській сировині і кормах для тварин не перевищував 7 %, а в готовій харчовій продукції – 1 %.

ВИЗНАЧЕННЯ ПРИСУТНОСТІ ГЛЮТЕНУ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР У ХАРЧОВІЙ ПРОДУКЦІЇ

Розроблення методології визначення глютенів пшениці, жита, ячменю та вівса на основі технології TaqMan® ПЛР-РЧ. Сьогодні як в Україні, так і в інших країнах світу актуальним є розроблення технологій виробництва харчових продуктів спеціалізованого призначення, спрямованих на профілактику та лікування аліментарно-залежних захворювань. До найбільш алергенних злакових культур, які призводять до розвитку целиакії, належать пшениця та її різновиди (камут, полба), жито, ячмінь та овес. З огляду на це, як молекулярно-генетичні маркери для визначення глютенів у сільськогосподарській сировині і харчовій продукції зазвичай використовують гени запасних білків зерна зазначених вище культур.

Рослинні накопичувальні протеїни відомі своєю високою специфічністю, тому як молекулярно-генетичний маркер для визначення ДНК пшениці (*Triticum aestivum*), а також деяких інших представників родини *Triticum* (полба, спельта) було обрано праймери/зонд (Tri) до гена запасного білка ω -гліадину (ω -gliadin). Як молекулярно-генетичний маркер для визначення ДНК жита (*Secale cereale*) та ячменю (*Hordeum vulgare*) було обрано гени запасних білків ω -секалін (ω -secalin) жита (праймери/зонд (Sec)) і B1 гордеїн (*B1 hordein*) ячменю (праймери/зонд (Hor)). ДНК-мішенню для детекції вівса (*Avena sativa*) було обрано ген запасного білка вівса авенін (*avenin*) з праймерами/зондом (Ave). Дані щодо нуклеотидних послідовностей генів брали із загальнодоступної бази даних GenBank® серверу NCBI: *Triticum aestivum* (AJ 567980.1; AJ 567959.1), *Triticum durum* (AJ 567953), *Triticum spelta* (AJ 567953.1), *Secale cereale* (AF000227), *Hordeum vulgare* (X03103), *Avena sativa* (J05486) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Праймери з зондами було розроблено К. Björklund (2008) за допомогою програмного забезпечення Primer Express®.

Оптимізацію роботи обраних праймерів проводили у форматі мультиплексу. Для цього було сформовано дві мультиплексні системи, які в подальшому лягли в основу тест-системи «Глютен-скринінг» (табл. 7).

7. Характеристика сформованих мультиплексних систем для визначення глютену чотирьох злакових культур

Мультиплекс №1			Мультиплекс №2		
Праймери	Канал	Мішень	Праймери	Канал	Мішень
Tri	Cy5	пшениця	Hor	Rox	ячмінь
Sec	Hex	жито	Psb2	Hex	рослина
Ave	Fam	овес			

До першого мультиплексу увійшли праймери для визначення пшениці, жита і вівса. Другий мультиплекс було сформовано з праймерів на ячмінь та праймерів Psb2 до гена хлоропластної ДНК, що кодує протеїн D1 фотосистеми II (*psbA*). Останню пару праймерів використовували як ендогенний контроль перебігу ПЛР. Первинне оцінювання роботи праймерів здійснювали за величинами граничного

циклу (Ct) та рівнем репортерної флуоресценції (ΔRn). Під час розроблення тест-системи на визначення присутності глютену оцінювали такі аналітичні характеристики як ефективність перебігу ПЛР, специфічність, чутливість, межа детектування, повторюваність та відтворюваність результатів аналізу.

Оптимізацію умов ампліфікації двох мультиплексних систем проводили за такими параметрами як температура гібридизації (Ta) праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Для оптимізації ПЛР за Ta праймерів було обрано чотири температурних значення – 55, 60, 63 та 65/66 °C. Для мультиплексної системи №1 для праймерів Tri, Sec та Ave оптимальною виявилась температура 60°C, для мультиплексу №2 з праймерами Hor, Psb2 – 65°C.

Для оптимізації ПЛР за концентрацією $MgCl_2$ було обрано від чотирьох до п'яти точок – 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 та 5,5 mM. Найкращі результати для двох мультиплексних систем, за якими спостерігались найменші значення Ct та найбільші значення ΔRn , було отримано за концентрації 3,5 mM. Стосовно показника концентрація та співвідношення праймерів / зондів, найкращі результати було отримано за 20 пкмоль/реакцію для праймерів та 10 пкмоль/реакцію для зондів.

Дослідження специфічності, ефективності та аналітичної чутливості тест-системи у форматі мультиплексів. Перевірку специфічності роботи праймерів та зондів двох мультиплексних систем проводили на зразках ДНК, що були ізольовані з таких культур як пшениця (*Triticum aestivum*), полба (*Triticum dicoccum*), спельта (*Triticum spelta*), жито (*Secale cereal*), овес (*Avena sativa*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), просо (*Panicum miliaceum*), амарант (*Amaranthus caudatus*), рис (*Oryza sativa*), кукурудза (*Zea mays*), гречка (*Fagopyrum esculentum*), томати (*Lycopersicon esculentum*), картопля (*Solanum tuberosum*), ріпак (*Brassica napus*), соя (*Glycine max*), ковила (*Stipa*), пирій повзучий (*Elymus repens*), тимофіївка лучна (*Phleum pratense*). Отримані результати підтвердили 100 % специфічність всіх пар праймерів до обраних ДНК-мішеней.

Ефективність роботи праймерів/зондів у форматі мультиплексів перевіряли шляхом проведення ПЛР з серією десятикратних розведень розчинів ДНК. Окремо досліджували кожну пару праймерів з зондом у складі мультиплексів №1 та №2 (табл. 8).

8. Ефективність проведення ПЛР з праймерами Tri, Sec, Ave, Hor, Psb2, що входять до складу мультиплексів №1 та №2

№	Назва	E, %	R ²	α
1	Tri	105,4	0,997	-3,198
	Sec	91,1	0,999	-3,557
	Ave	96,3	0,997	-3,414
2	Hor	97,7	0,998	-3,377
	Psb2	97,4	0,998	-3,385

Дослідження з оцінювання ефективності роботи праймерів у складі мультиплексу №1 показали, що значення кутів нахилу α для праймерів Tri (-3,198) Sec (-3,557) та Ave (-3,414) вкладалися в бажаний діапазон від -3,58 до -3,10, а

показники R^2 були не нижчими за 0,99. Розраховані значення ефективності перебігу ПЛР становили 105,4 % для каналу *Cy5* (*Tri*), 91,1% – для каналу *Hex* (*Sec*) та 96,3 % – для *Fam* (*Ave*). Щодо мультиплексу №2, то значення кутів нахилу α для праймерів *Hor* (-3,377) та *Psb2* (-3,385) вкладалися в рекомендований діапазон від -3,58 до -3,10. Показники R^2 дорівнювали 0,998 та 0,998 відповідно і були не нижчими за 0,99. Розраховані значення ефективності перебігу ПЛР становили 97,7% для каналу *Rox* (*Hor*) та 97,4 % для *Hex* (*Psb2*).

Для визначення межі виявлення (LOD) та аналітичної чутливості двох мультиплексних систем №1 та №2 готували серії десятикратних розведень препаратів ДНК. Кожна серія нараховувала шість точок, які лежали в діапазоні від 1×10^2 до 1×10^{-3} нг ДНК. Кожну точку аналізували у 10 повторностях. На підставі отриманих даних було визначено межу виявлення та аналітичну чутливість двох мультиплексів, що входять до складу тест-системи (табл. 9). Під час проведення ПЛР-РЧ позитивними вважали всі зразки зі значенням $C_t \leq 45$.

Проведені дослідження уможливили розроблення тест-системи «Глютен-скринінг» на основі технології *TaqMan*[®] методу ПЛР-РЧ для виявлення та ідентифікації у харчових продуктах та продовольчій сировині чотирьох злакових культур (пшениці, жита, вівса і ячменю), присутність глютену в яких може призводити до виникнення у людини захворювання на целиацію. Тест-система уможливорює аналіз продуктів, які піддавались термічній обробці, ферментації, гідролізу, її рівень чутливості достатній для виявлення так званого прихованого глютену. Специфічність розробленої тест-системи становить 100 %, аналітична чутливість знаходиться у межах від 1×10^{-2} до 1×10^{-1} нг.

9. Межа виявлення (LOD) та аналітична чутливість мультиплексних систем №1 і №2 тест-системи «Глютен-скринінг»

№	Назва тест-системи	LOD (нг)	Аналітична чутливість (нг)
1	Мультиплекс №1	1×10^{-1}	1×10^{-1}
2	Мультиплекс №2	1×10^{-2}	1×10^{-2}

Апробацію тест-системи проводили шляхом порівняльних випробувань з комерційними ІФА та ПЛР тест-наборами – RIDASCREEN[®] Gliadin та SureFood[®] ALLERGEN ID Gluten (R-Biopharm, Німеччина). Було досліджено 53 зразки продовольчої сировини і харчової продукції з відомим складом. Отримані результати продемонстрували, що розроблена тест-система «Глютен-скринінг» дає змогу виявляти та ідентифікувати присутність пшениці, жита, ячменю та вівса як у сировині (крупа, борошно), так і в продуктах, що піддавались термічній обробці, ферментації або гідролізу. Таким чином, запропонована тест-система може бути використана як скринінговий тест для якісного аналізу харчової продукції на вміст глютену. У 2012 р. в ДП «Укрметртестстандарт» було розроблено та затверджено методику виконання вимірювань (МВИ 17/59-12) з визначення глютену злакових культур за допомогою розробленої тест-системи «Глютен-скринінг».

ДІАГНОСТИКА БАКТЕРІАЛЬНИХ ПАТОГЕНІВ З АЛІМЕНТАРНИМ ШЛЯХОМ ПЕРЕДАЧІ ЗА ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ

Застосування технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі для ідентифікації харчових патогенів. Серед мікробних контамінантів харчових продуктів дедалі більше поширюються збудники нових захворювань або бактерії зі зміненими властивостями та додатковими факторами патогенності. Технологія *TaqMan*[®] ПЛР-РЧ уможливорює надійну ідентифікацію патогенної мікрофлори. До харчових патогенів, швидкість та точність визначення яких має першочергове значення, можна віднести *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. та *Shigella* spp.

Як молекулярно-генетичний маркер для визначення *L. monocytogenes* запропоновано видоспецифічну ділянку гена *hly*. Цей ген кодує бактеріальний білок лістеріолізін О, який виконує функцію лізису первинної і вторинної фагосом. Праймери з зондами для ампліфікації фрагменту гена *hly* описано LeMonnier (2011). Підбір праймерів здійснено після процедури вирівнювання нуклеотидної послідовності гена *hly* *L. monocytogenes* з послідовностями інших цитолізинів, опублікованих в GenBank, – пневмолізином (PLY) *Streptococcus pneumoniae*, перфріголізином (PFO) *Clostridium perfringens*, стрептолізином (LSO) *Streptococcus pyogenes*, іванолізином О (IVO) *L. ivanovii* та селегеріолізином О (LSO) *L. seeligeri*.

Маркерним геном для визначення представників *Salmonella* spp. було обрано ген *invA*, що кодує інвазійний білок InvA (invasion protein InvA). До хромосомного локусу *inv* належить 14 генів, найбільш відомими з яких є *invA*, *invE*. Продукти даних генів забезпечують бактеріям можливість здійснення інвазії крізь епітеліальні клітини кишківника. Праймери з зондом для ампліфікації ділянки гена *invA* було описано Gonzalez-Escalona (2009). Нуклеотидну послідовність цього гена наведено в GenBank[®] серверу NCBI (№ доступу DQ644631).

Найбільш прийнятним кандидатом на роль гена-маркера для визначення *Shigella* spp. є ген *ipaH*, який кодує інвазивний плазмідний антиген. *ipaH* – унікальний для *Shigella* spp. мультикопійний ген, який присутній як у складі інвазивної плазмиди, так і в хромосомній ДНК. Праймери з зондом для ампліфікації фрагменту гена *ipaH* було розроблено Lin (2009) за використання нуклеотидної послідовності, представленої в GenBank[®] (№ доступу M76445).

Первинне оцінювання роботи олігонуклеотидів показало, що обрані праймери з зондами давали дуже сильний сигнал за показником Ct (13,81-24,95) та дещо низький – за ΔRn (250–500 rfu). Тому наступним етапом досліджень була оптимізація роботи всіх трьох пар праймерів з зондами (*hly*, *invA*, *ipaH*) у форматі мультиплексів. Для проведення процедури оптимізації було сформовано три мультиплекси, що в подальшому лягли в основу тест-систем «*L. monocytogenes* - ідентифікація», «*Salmonella* spp. - ідентифікація», «*Shigella* spp. – ідентифікація». Як ендогенний контроль перебігу ПЛР-РЧ у всіх системах використано послідовність бактеріального гена *16S рДНК* та універсальні праймери b16S, описані Nadkarni (2002). Широку специфічність універсальної системи детекції було підтверджено тестуванням зразків ДНК, виділених із 34 видів бактерій, що охоплюють більшість груп бактерій, описаних у *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Оптимізацію умов ампліфікації проводили за такими параметрами як температура гібридизації (T_a) праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Оптимізацію за T_a праймерів проводили в діапазоні від 60 до 68°C у форматі 2- та 3-стадійної ПЛР. Найкращі результати отримано за $T_a=60^\circ C$ та 2-стадійним протоколом ампліфікації. Для оптимізації ПЛР-РЧ за концентрації $MgCl_2$ було обрано три точки – 1,5; 2,5 та 3,5 мМ. Найбільш оптимальна концентрація $MgCl_2$ для розроблених мультиплексних систем становила 3,5 мМ. За показником концентрація і співвідношення праймери/зонд оптимальними виявились – 5 пкмоль/реакцію для праймерів та 2,5 пкмоль/реакцію для зондів.

Дослідження специфічності, ефективності та аналітичної чутливості тест-систем у форматі мультиплексів. Перевірку специфічності роботи праймерів та зондів у форматі мультиплексу здійснювали тестуванням зразків ДНК, ізольованої із таких організмів: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhi*, *S. paratyphi B*, *S. typhimurium*, *S. umbilo*, *Shigella dysenteriae* 1, *Sh. dysenteriae* 2, *Sh. sonnei*, *Sh. sonnei* 1a, *Sh. flexneri* 1a, *Sh. flexneri* 1b, *Sh. boydii* 1, *Sh. boydii* 2, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus morgani*, *P. mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Glycine max*, *Salmo salar*, *Gallus gallus*, *Bos taurus* і *Homo sapiens*.

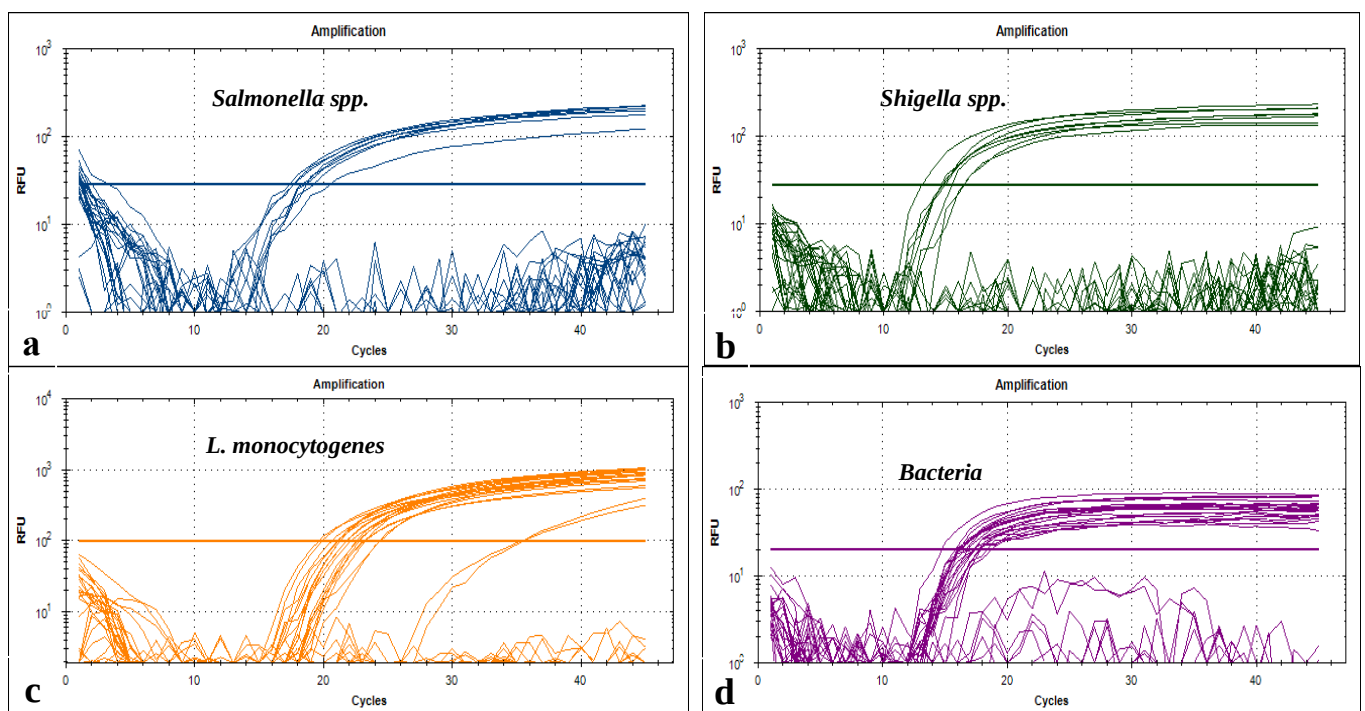


Рис. 7. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ під час перевірки специфічності праймерів: (a) – hly / Rox, (b) – invA / Fam, (c) – iraH / Hex, (d) – b16S / Cy5.

Під час проведення перевірки на специфічність перехресних реакцій виявлено не було. Позитивні сигнали з праймерами hly, invA, iraH було отримано лише на ДНК тих мікроорганізмів, до яких вони підбиралися. Значення C_t для праймерів hly коливалися у межах 19,41–24,95, у поодиноких випадках – 34,88–35,13. Для праймерів invA та iraH значення C_t знаходилися в межах 16,72–19,67 та 13,04–16,35

відповідно. Стосовно праймерів b16S, специфічних для ДНК широкого кола бактерій, значення Ct варіювало від 16,79 до 24,95 (рис. 7). Результати досліджень підтвердили 100% специфічність всіх обраних праймерів.

Ефективність роботи олігонуклеотидів у форматі мультиплексу перевіряли шляхом проведення ПЛР-РЧ з серією десятикратних розведень препаратів ДНК. Окремо досліджували кожен з трьох мультиплексів: hly+b16S, invA+b16S та ipaH+b16S. Для дослідження використовували свіжі препарати ДНК, виділені із заморожених клітин *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*. Якість зразків ДНК перевіряли спектрофотометрично. Дані таблиці 10 демонструють високу ефективність розроблених мультиплексних тест-систем.

10. Оцінка ефективності роботи трьох мультиплексних тест-систем

Тест-система	Праймери	Е, %	R ²	α
L. monocytogenes-ідентифікація	hly	95,1	0,980	-3,445
	b16S	92,0	0,980	-3,530
Salmonella spp.-ідентифікація	invA	99,7	0,992	-3,330
	b16S	96,0	0,996	-3,422
Shigella spp.-ідентифікація	ipaH	94,6	0,999	-3,457
	b16S	92,5	0,998	-3,517

Визначення межі виявлення (LOD) та аналітичної чутливості розроблених тест-систем перевіряли шляхом приготування серії десятикратних розведень ДНК (9 точок) в діапазоні від 1×10^2 до 1×10^{-6} нг. Кожну точку аналізували у 10 повторностях. На підставі отриманих даних було визначено межу виявлення та аналітичну чутливість мультиплексних тест-систем (табл. 11).

11. Межа виявлення (LOD) та аналітична чутливість розроблених тест-систем

№	Назва тест-системи	LOD (копій)	Аналітична чутливість (ГЕ/мл)
1	L. monocytogenes - ідентифікація	3,17	$15,9 \times 10^3$
2	Salmonella spp. - ідентифікація	1,91	$0,9 \times 10^3$
3	Shigella spp. - ідентифікація	20,1	$1,0 \times 10^3$

Для оцінювання можливості використання розроблених тест-систем «L. Monocytogenes-ідентифікація», «Salmonella spp.-ідентифікація» та «Shigella spp.-ідентифікація» для визначення відповідних патогенів у харчовій продукції було проведено серію досліджень на попередньо охарактеризованих зразках ДНК гомо- і гетерологічних патогенних мікроорганізмів (n=47), а також зразках харчової продукції, попередньо охарактеризованих мікробіологічними методами досліджень (n=26). Отримані результати продемонстрували, що розроблені тест-системи здатні ідентифікувати ДНК *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* і *Shigella spp.* зі специфічністю 100%.

МЕТОДОЛОГІЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ОЦІНЮВАННЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ ПРОДУКЦІЇ

Будь-яке наукове дослідження базується на методології, яка визначає послідовність залучення різних форм знань і дає змогу здійснити основні принципи наукових досліджень – об'єктивність, відтворюваність, доказовість і точність отриманих результатів. Методологія багатовимірна і становить сукупність принципів, методів, способів організації наукової діяльності, які можуть застосовуватися в будь-яких галузях науки. У дисертаційній роботі розроблено методологію молекулярно-генетичного оцінювання показників безпечності та якості сільськогосподарської продукції тваринного і рослинного походження за допомогою сучасних методів молекулярно-генетичного аналізу (рис. 8).



Рис. 8. Загальна схема застосування методології молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції.

Методологія становить сукупність методів, в яких послідовності ДНК як основи спадкового матеріалу живих організмів (вірусів, бактерій, рослин, тварин) використовуються для молекулярно-генетичного маркування ряду ознак, що дають змогу контролювати низку показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини і харчової продукції.

Підсумовуючи викладені у дисертаційній роботі результати, можна відзначити, що розроблена методологія молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції становить сукупність методів генетичного аналізу, які базуються на аналізі поліморфізму послідовностей ДНК у геномах рослин, тварин і мікроорганізмів. Вони уможливають системний аналіз безпечності та якості харчових продуктів як тваринного, так і рослинного походження, і гарантують високий рівень повторюваності та відтворюваності результатів.

ВИСНОВКИ

1. Теоретично обґрунтовано методологію молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції і практично реалізовано її підходи для генетичного моніторингу безпечності і якості продовольчої сировини і харчової продукції.

2. Оптимізовано методику дослідження генетичної структури популяцій великої рогатої худоби за генами-маркерами молочної продуктивності – *CSNK*, *BLG* та *PRL*. Встановлено взаємозв'язки між генотипами та комплексами генотипів досліджених QTL і параметрами молочної продуктивності (надій, масова частка жиру, масова частка білка) та технологічними властивостями молока (сиропридатність).

3. Виявлено внутрішньопородні особливості зв'язку комплексів генотипів поліморфних локусів з проявом господарсько-корисних ознак в двох популяціях української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби. З'ясовано, що комплексні генотипи *CSNK AA / BLG AA / PRL AG*, *CSNK AA / BLG AA / PRL GG* та *CSNK AB / BLG AA / PRL AG* асоційовані з високою молочною продуктивністю, *CSNK AA / BLG AA / PRL AG*, *CSNK AA / BLG AA / PRL GG* та *CSNK AA / BLG AB / PRL GG* – з високими показниками масової частки жиру в молоці, *CSNK AB / BLG AA / PRL AG*, *CSNK AB / BLG BB / PRL AG* – з високими показниками вмісту білка. Найкращі показники тривалості сичужного зсідання молока були притаманні тваринам з комплексними генотипами *CSNK AB / BLG BB / PRL GG* та *CSNK AB / BLG AB / PRL GG*.

4. Використання технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі для ідентифікації збудника лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ, BLV) у молоці корів, яка базується на аналізі консервативної ділянки гена *Env*, що кодує поверхневий вірусний глікопротеїд gp51, уможливорює високоточну діагностику поголів'я на захворюваність лейкозом. Порівняльна діагностика за використання РІД-аналізу та розробленої тест-системи на основі методу ПЛР у реальному часі підтвердила більшу ефективність молекулярно-генетичного методу завдяки вищій чутливості і специфічності (на 4,4 %).

5. За використання як молекулярно-генетичних маркерів ділянок генів 16S рРНК та фактору елонгації Tu для якісної та кількісної ідентифікації бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus* було розроблено метод визначення корисної мікрофлори у складі молочної продукції на основі технології SYBR®Green методу ПЛР-РЧ та доведено можливість ідентифікації групи молочнокислих бактерій та біфідобактерій у готовій молочній продукції під час контролю складу молочної мікрофлори, а також під час створення нових заквасок, пробіотиків та пробіотичних продуктів.

6. Використання видоспецифічних молекулярно-генетичних маркерів та технології TaqMan® методу ПЛР у реальному часі дає змогу відносно швидко виявляти фальсифікацію видової належності м'яса у складі сільськогосподарської сировини і харчової продукції. Так, розроблена мультиплексна ПЛР-РЧ тест-система «М'ясо-тест» для одночасної детекції трьох видів м'яса – курятини, свинини та яловичини – має межу виявлення не менш ніж 1×10^{-6} нг, стовідсоткову специфічність та аналітичну чутливість на рівні 1×10^{-5} нг (0,1 нг/мл).

7. Підібрано видо- та родоспецифічні молекулярно-генетичні маркери для ідентифікації зоонозних харчових бактеріальних патогенів – *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* та *Shigella spp.* Порівняльний аналіз класичних методів діагностики бактеріальних патогенів і технології TaqMan® методу ПЛР у реальному часі довів високу чутливість, специфічність та відтворюваність молекулярно-генетичного методу аналізу. Так, розроблена серія мультиплексних ПЛР-РЧ тест-систем «*L. Monocytogenes*-ідентифікація», «*Salmonella spp.*-ідентифікація», «*Shigella spp.*-ідентифікація» для ідентифікації збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу у сільськогосподарській продукції тваринного та рослинного походження характеризується специфічністю 100 % і аналітичною чутливістю у межах $n \times 10^3$ ГЕ/мл.

8. Використання видоспецифічних молекулярно-генетичних маркерів зернових (ω-гліадини пшениці та жита, B1 hordein ячменю, avenin вівса) та технології TaqMan® методу ПЛР у реальному часі уможливорює ідентифікацію у складі сільськогосподарської сировини і готової до споживання харчової продукції ДНК злакових культур, глютен у складі яких може спричиняти захворювання на целиакію у людей. Розроблена мультиплексна тест-система «Глютен-скринінг» характеризується високою специфічністю – 100 % та аналітичною чутливістю – у межах від 1×10^{-2} до 1×10^{-1} нг.

9. Проведено моніторинг існуючих в Україні ліній біотехнологічних сільськогосподарських культур (ГМО, ГМР) і розроблено методологію якісного та кількісного аналізу сільськогосподарської сировини, кормів для тварин та харчової продукції на вміст елементів генно-інженерних конструктів.

10. Встановлено особливості поліморфізму структурних елементів генно-інженерних конструктів, використаних для розроблення генетично модифікованих рослин, і підібрано молекулярно-генетичні маркери для їх ідентифікації.

11. Розроблено і впроваджено у виробництво діагностичні тест-системи загальною кількістю 51 найменування для ідентифікації, якісного та кількісного визначення ГМО за допомогою технології TaqMan® методу ПЛР у реальному часі.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. З метою запобігання фальсифікації видової приналежності м'яса випробувальним лабораторіям рекомендовано використовувати розроблену і апробовану мультиплексну тест-систему «М'ясо-тест» на основі технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі, яка уможлиблює одночасну ідентифікацію трьох різних мішеней – ДНК курки, свині та корови.

2. Для здійснення контролю сільськогосподарської сировини та харчової продукції на вміст патогенної мікрофлори (*L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*) випробувальним лабораторіям рекомендовано використовувати розроблені і апробовані мультиплексні тест-системи «*L. Monocytogenes*-ідентифікація», «*Salmonella spp.*-ідентифікація» та «*Shigella spp.*-ідентифікація» на основі технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі.

3. Для здійснення контролю за виготовленням безглютенової продукції і проведення скринінгового аналізу рекомендовано використовувати розроблену і апробовану тест-систему «Глютен-скринінг» на основі технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі, яка уможлиблює ідентифікацію слідових кількостей пшениці, жита, ячменю і вівса (МВИ 17/59-12).

4. У випробувальних лабораторіях України, акредитованих згідно ДСТУ ISO 17025, рекомендовано використовувати для визначення ГМО в сільськогосподарській продукції, кормах для тварин та харчовій продукції серію тест-систем «ГМО скринінг», «ГМО кількість» та «ГМО ідентифікація» загальною кількістю 51 найменування (ТУ У 24.6-02568182-001:2011, ТУ У 20.1-40719638-001:2019, патент України на корисну модель № 72083).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографії

1. Мельничук М.Д., Ткачук В.А., Новак Т.В., Балан О.Д., Суліма Н.М., **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Соціально-економічний потенціал трансгенних сільськогосподарських культур в біоенергетиці України: монографія. Київ: ЦП Компринт, 2013. 204 с. *(Здобувачем викладено частину основного змісту)*.

2. Димань Т.М., Козловська М.В., **Облап Р.В.**, Дубін О.В., Кравченко О.І. Генетично модифіковані сільськогосподарські культури: прогрес, проблеми, перспективи: монографія / за ред. Т.М. Димань, Л.Г.Шморгун. Серія: Імплементация європейських норм і практик. Регулювання ринків та дослідництво в умовах СОТ. Київ: Проблеми інноваційно-інвестиційного розвитку, 2013. 158 с. *(Здобувачем викладено частину основного змісту)*.

Публікації у наукових фахових виданнях України

3. Мельничук М.Д., Новак Н.Б., **Облап Р.В.** Особливості генетичної структури української чорно-рябої худоби. *Вісник аграрної науки*. 2008. № 3. С. 42–46. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту)*.

4. Новак Н.Б., **Облап Р.В.**, Мельничук М.Д. Діагностика провірусної ДНК вірусу лейкозу Великої Рогатої Худоби. *Вісник аграрної науки*. 2008. № 11. С. 22–24. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту)*.

5. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Семенович В.К., Димань Т.Н. Розроблення діагностичної тест-системи для якісного визначення ГМО у продовольчій сировині і харчових продуктах. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. 2012. Вип. 7(90). С. 78–81. *(Здобувачем здійснено збір інформації, проведення досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків)*.

6. **Облап Р.В.** Кількісне визначення генетично модифікованої сої та кукурудзи методом ПЛР у реальному часі. *Вісник аграрної науки*. 2012. № 8. С. 53–56.

7. Новак Н.Б., **Облап Р.В.** Біотехнологічні підходи щодо комплексної оцінки генетичної структури поголів'я ВРХ та вдосконалення показників молочної продуктивності. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2012. Вип. 4(69), Т. 2(1). С. 106–110. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків)*.

8. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Ідентифікація генетично модифікованої кукурудзи лінії MON 810 у продовольчій сировині та харчових продуктах методом ПЛР-РЧ. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. 2013. Вип. 9(103). С. 8–11. *(Здобувачем здійснено збір інформації, проведення досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків)*.

9. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Ідентифікація *Listeria Monocytogenes* методом ПЛР у реальному часі в продуктах тваринництва. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2013. Вип. 4(75), Т. 2(1). С. 143–147. *(Здобувачем здійснено збір*

інформації, проведення досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).

10. **Облап Р.В.** Визначення представників *SALMONELLA SPP.* методом ПЛР у реальному часі. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. 2013. Вип. 10(105). С. 60–64.

11. Novak T., **Oblap R.**, Novak N. Socioeconomic prerequisites for the use of genetically modified crops in Ukraine. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2013. Т. 11, №1. С. 106–111. (Здобувачем викладено частину основного змісту).

12. Novak N.B., **Oblap R.V.** Studies of food production and raw materials' content relatively to genetically modified ingredients. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2014. Т. 12, № 1. 52–57. (Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).

13. **Облап Р.В.** Моніторинг продуктів харчування та сільськогосподарської сировини в Україні на вміст генетично модифікованих інгредієнтів. *Вісник аграрної науки*. 2014. № 1. С. 59–63.

14. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Розробка мультиплексної ПЛР тест-системи для швидкої діагностики деяких харчових патогенів. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Збірник наукових праць Харківської державної зооветеринарної академії*. 2014. Вип. 28(2). С. 93-97. (Здобувачем здійснено збір інформації, проведення досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).

15. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Розроблення тест-систем на основі ПЛР-РЧ для визначення видової належності тканин у складі харчових продуктів. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. 2014. Вип. 2 (112). С. 112–115. (Здобувачем здійснено збір інформації, проведення досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).

16. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Семенович В.К., Димань Т.М. Визначення присутності глютену злакових культур у харчових продуктах методом ПЛР-РЧ. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. 2015. Вип. 1(116). С. 111–116. (Здобувачем здійснено збір інформації, проведення досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).

17. **Облап Р.В.** Розроблення підходів до визначення генетично модифікованого ріпаку та моніторинг його розповсюдження в Україні. *Вісник аграрної науки*. 2016. № 7. С. 43–48.

18. Плівачук О.П., Димань Т.М., **Облап Р.В.** Сиропридатність молока корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами капа-казеїну, бета-лактоглобуліну та пролактину. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. 2016. Вип. 2(129). С. 116–121. (Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту).

19. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Моніторинг поширення біотехнологічних культур в Україні. *Вісник Уманського національного університету*. 2017. № 1. С. 56–59. (Здобувачем здійснено збір інформації,

проведення досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).

20. **Облап Р.**, Новак Н., Димань Т. Дослідження меду на вміст пилку з генетично модифікованих рослин методом ПЛР у реальному часі. *Науковий вісник НУБіП України. Серія «Лісництво та декоративне садівництво»*. 2017. Вип. 278. С. 216–223. *(Здобувачем здійснено збір інформації, проведення досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

21. **Облап Р. В.**, Новак Н. Б., Димань Т. М. Моніторинг харчових продуктів, кормів та сільськогосподарської сировини в Україні на вміст генетично модифікованих інгредієнтів. *Біоресурси і природокористування*. 2018. Т. 10, № 3-4. С. 49–55. *(Здобувачем здійснено збір інформації, проведення досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

22. **Облап Р. В.** Внутрішньолaborаторна валідація методу визначення видової приналежності м'яса за використання ПЛР-РЧ тест-системи «М'ясо-тест». *Наукові горизонти. Вісник Житомирського національного агроекологічного університету*. 2018. № 9-10. С. 96–103.

Публікації у виданнях іноземних держав або у виданнях України, які включено до міжнародних наукометричних баз

23. Новак Н.Б., **Облап Р.В.**, Мельничук М.Д. Використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки генетичного потенціалу української чорно-рябої породи ВРХ. *Біологія тварин*. 2008. Т. 10, № 1-2. С. 282–286. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту).*

24. **Облап Р.В.** Сучасні методи визначення ГМО в харчових продуктах та продовольчій сировині рослинного походження. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2012. Вип. 10 (20). С. 117–121.

25. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Аналіз генетичної структури ВРХ та біотехнологічні підходи щодо вдосконалення показників молочної продуктивності. *Вісник сумського національного аграрного університету*. 2012. Вип. 12 (21). С. 73–76. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

26. Зеленая Л.Б., Коваленко Н.К., **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Голубец Р.А. Использование ПЦР в реальном времени для количественной оценки молочнокислых и бифидобактерий в молочных продуктах. *Мікробіологічний журнал*. 2012. Т. 74, № 1. С. 14–19. *(Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

27. **Облап Р.В.**, Димань Т.М., Новак Н.Б., Семенович В.К. Моніторинг харчових продуктів та продовольчої сировини на наявність генетично модифікованої сої лінії GTS 40-3-2. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2013. Вип. 1 (22). С. 125–129. *(Здобувачем здійснено збір інформації, проведення досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).*

28. Глебов А., Голубець Р., **Облап Р.**, Малієнко В., Новак Н., Волошинець В., Чичерін М. Результати 2-го раунду програми міжlaborаторних порівнянь результатів вимірень. *Метрологія та прилади*. 2014. № 5. С. 26–31. *(Здобувачем*

здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).

29. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Виявлення вірусу лейкозу ВРХ у молоці методом ПЛР в реальному часі. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2014. Вип. 7 (26). С. 118–121. (Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).

30. Varzatskii O.A., Vologzhanina A.V., Novikov V.V., Vakarov S.V., **Oblap R.V.**, Voloshin Y.Z. Inhibition of DNA synthesis in the transcription system of Taq DNA polymerase by various iron and cobalt(II) tris-dioximate clathrochelates: In vitro study and X-ray structure of leader inhibitors, the carboxyl-terminated macrobicyclic complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 2018. Vol. 482. P. 90–98. (Здобувачем здійснено частину досліджень, аналіз результатів, викладення частини основного змісту, формування висновків).

Наукові праці апробаційного характеру

31. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Новак Н.Б., **Облап Р.В.** Селекція сільськогосподарських культур з підвищеним адаптивним потенціалом. *Проблеми підвищення адаптивного потенціалу системи рослинництва у зв'язку зі змінами клімату*: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. Біла Церква, Україна, 2008. Біла Церква. С. 51–52.

32. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Малієнко В.А., Голубець Р.А., Семенович В.К. Діагностика генетично модифікованих організмів рослинного походження методом ПЛР в реальному часі. *Екотрофологія. Аспекти продовольчої та харчової безпеки*: III міжнародна науково-практична конференція. Біла Церква, Україна, 2009. С. 143–144.

33. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Продукти харчування з генетично модифікованою складовою. *Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека*: міжнародна науково-практична конференція. Одеса, Україна, 2010. С. 109.

34. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Малієнко В.А., Голубець Р.А., Семенович В.К. Якісне визначення ГМ ріпаку методом ПЛР-РЧ. *Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека*: міжнародна науково-практична конференція. Одеса, Україна, 2010. С. 110.

35. Новак Н.Б., Зелена Л.Б., **Облап Р.В.** Ідентифікація та кількісна оцінка молочнокислих бактерій та біфідобактерій за допомогою методу ПЛР у реальному часі. *Шевченківська весна 2012: біологічні науки*: X міжнародна конференція. Київ, Україна, 2012. С. 230.

36. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Малиєнко В.А. Разработка диагностических тест-систем для определения ГМО. *Сучасні проблеми біології, екології та хімії*: III міжнародна науково-практична конференція. Запоріжжя, Україна, 2012. С. 366.

37. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Т.Н.Димань, Новак Т.В. Количественная оценка содержания молочнокислых и бифидобактерий в молочных продуктах методом ПЦР-РВ. *Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы*: международная научная конференция. Минск, Беларусь, 2012. С. 166.

38. Новак Н.Б., **Облап Р.В.**, Новак Т.В. Биотехнологические аспекты улучшения показателей молочной продуктивности КРС. *Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы*: международная научная конференция. Минск, Беларусь, 2012. С. 141.

39. Малиенко В.А., **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Голубец Р.А., Семенович В.К. Динамика распространения генетически модифицированных организмов в пищевых продуктах. *Трансгенные растения: технология создания, биологические свойства, применение, биобезопасность*: IV всероссийский симпозиум. Москва, Россия, 2012. С. 69.

40. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Застосування методу Real-Time PCR для виявлення та ідентифікації глютенів злакових культур в продуктах харчування. *Екологія / Ecologi-2013*: IV всеукраїнський з'їзд екологів з міжнародною участю. Вінниця, Україна, 2013. С. 384–386.

41. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Розробка сучасного методу визначення глютену в продуктах харчування. *Актуальные вопросы биологии, экологии, медицины и фармакологии*: научно-практическая конференция с международным участием. Днепропетровск, Украина, 2013. С. 80–81.

42. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Федько О.І., Лазарева А.М., Димань Т.М. Ідентифікація представників *Salmonella* spp. методом ПЛР у реальному часі. XIII з'їзду товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (ТМУ). Ялта, Україна, 2013. С. 403.

43. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Моніторинг харчової продукції щодо вмісту глютену злакових культур. *Екотрофологія. Прогрес, проблеми, перспективи екологічно безпечного виробництва*: IV міжнародна науково-практична конференція. Біла Церква, Україна, 2013. С. 27–29.

44. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Семенович В.К., Димань Т.М. Розроблення серії діагностичних тест-систем на основі методу ПЛР у реальному часі для якісного та кількісного визначення ГМО у продовольчій сировині і харчових продуктах. *Екотрофологія. Прогрес, проблеми, перспективи екологічно безпечного виробництва*: IV міжнародна науково-практична конференція. Біла Церква, Україна, 2013. С. 71–72.

45. Новак Н.Б., **Облап Р.В.**, Малиєнко В.А., Голубець Р.А., Семенович В.К. Чи є Україна зоною вільною від ГМО? *Новітні досягнення біотехнології*: II міжнародна науково-практична конференція. Київ, Україна, 2013. С. 106–107.

46. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Семенович В.К., Махинько Л.В., Димань Т.М. Розробка та впровадження новітніх методів детекції ГМО в продуктах харчування та с/г сировині рослинного походження. *Якість і безпека харчових продуктів*: міжнародна науково-технічна конференція. Київ, Україна, 2013. С. 75–76.

47. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Застосування методу ПЛР у реальному часі в діагностиці *Listeria monocytogenes*. *Проблеми ветеринарної паразитології та якості і безпеки продуктів тваринництва*: всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція. Полтава, Україна, 2014. С. 154–157.

48. Новак Н.Б., **Облап Р.В.** Розробка діагностичних тест-систем для здійснення моніторингу розповсюдження ГМО в продуктах харчування та

продовольчій сировині. *Біологічні дослідження–2014: V всеукраїнська науково-практична конференція*. Житомир, Україна, 2014. С. 287–289.

49. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Семенович В.К. Моніторинг обігу ГМО в Україні. *X Всеукраїнські наукові Таліївські читання*. Харків, Україна, 2014. С. 154–157.

50. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Использование метода ПЦР в реальном времени для идентификации представителей *Shigella spp.* в продуктах питания. *Современные биотехнологии для науки и практики: Международная научно-практическая конференция*. Санкт-Петербург, Россия, 2014. С. 35–36.

51. Новак Н.Б., **Облап Р.В.**, Димань Т.М. Застосування методу ПЛР у реальному часі (Real-Time PCR) при оцінці деяких показників якості та безпеки харчової продукції. *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014: наукова конференція молодих вчених*. Київ, Україна, 2014. С. 20.

52. Новак Н.Б., **Облап Р.В.**, Димань Т.М. Ідентифікація вірусу лейкозу ВРХ у молоці за допомогою сучасних методів молекулярної діагностики. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: наукова-практична конференція молодих вчених*. Київ, Україна, 2014. С. 39.

53. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Димань Т.М. Використання сучасних біотехнологічних підходів для оцінки якості і безпеки харчової продукції та продовольчої сировини. *Стратегічні напрями розвитку тваринництва в Україні у контексті національної продовольчої безпеки: міжнародна науково-практична конференція*. Біла Церква, Україна, 2014. С. 127–128.

54. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Разработка мультиплексной ПЦР тест-системы для выявления и видовой идентификации глютенa в пищевой продукции. *Современные биотехнологии для науки и практики: II международный симпозиум*. Санкт-Петербург, Россия, 2015. С. 28–30.

55. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Малієнко В.А., Голубець Р.А., Семенович В.К. Застосування сучасних методів ДНК-діагностики для оцінки деяких показників безпеки та якості харчової продукції. *Екологія/Ecology-2015: V всеукраїнський з'їзд екологів з міжнародною участю*. Вінниця, Україна, 2015. С.17–19.

56. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Семенович В.К., Махинько Л.В., Димань Т.М. Моніторинг харчової продукції вітчизняного виробництва щодо вмісту ГМ інгредієнтів. *Якість і безпека харчових продуктів: II міжнародна науково-технічна конференція*. Київ, Україна, 2015. С.327–329.

57. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Малієнко В.А., Голубець Р.А. Розроблення підходів щодо визначення ГМ ріпаку та моніторинг його розповсюдження в Україні. *Селекційно-генетична наука і освіта: V міжнародна наукова конференція*. Умань, Україна, 2016. С. 267–270.

58. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Использование современных биотехнологических подходов для оценки качества и безопасности пищевых продуктов. *Современные биотехнологии для науки и практики: III международная конференция*. Санкт-Петербург, Россия, 2016. С. 30–32.

59. Новак Н.Б., **Облап Р.В.**, Голубець Р.А., Семенович В.К. Розроблення підходів щодо визначення трансгенних рослин та моніторинг їх розповсюдження в Україні. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології*

тварин: щорічна науково-практична конференція молодих вчених. Київ, Україна, 2016. С. 57–59.

60. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Семенович В.К. Моніторинг розповсюдження біотехнологічних культур в Україні за 2013-2016 роки. *Продовольчі ресурси: проблеми і перспективи*: IV міжнародна науково-практична конференція. Київ, Україна, 2016. С. 58–61.

61. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Семенович В.К., Махинько Л.В., Димань Т.М. Забезпечення належного рівня контролю безпеки та якості харчової продукції в Україні. *Оздоровчі харчові продукти та дієтичні добавки: технології, якість та безпека*: міжнародна наукова конференція. Київ, Україна, 2017. С. 117–118.

62. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Махинько Л.В. Проблема обігу ГМО в Україні. *Якість і безпека харчових продуктів*: II міжнародна науково-практична конференція. Київ, Україна, 2017. С. 356–357.

63. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Голубець Р.А., Ример В.Д. Розробка та валідація методу визначення трансгенної ДНК з пилку меду. *Біологічні дослідження - 2018*: IX всеукраїнська науково-практична конференція. Житомир, Україна, 2018. С. 326–327.

64. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Новицька Н.М., Голубець Р.А., Семенович В.К. Використання діагностичних тест-систем виробництва ДП «Укрметртестстандарт» в контролі обігу ГМО в Україні. *Проблемы и состояние использования ГМО в пищевых продуктах*: міжнародна науково-практична конференція. Львів, Україна, 2018. С. 23–25.

Додатково відображають наукові результати дисертації

65. Мельничук М.Д., Спиридонов В.Г., **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Методичні вказівки до виконання лабораторно-практичних робіт з дисципліни „Генетична інженерія”. Київ: Видавничий центр НАУ, 2007. 30 с.

66. Мельничук М.Д., Новак Т.В., **Облап Р.В.** Біотехнологія та підвищення адаптивного потенціалу сільськогосподарських культур. Генетично модифіковані організми: проблеми і перспективи використання їх в Україні. К.: Аграрна наука, 2008. С. 89–97.

67. Мельничук М.Д., **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Використання методу полімеразної ланцюгової реакції в тваринництві. Методичний посібник. К.: НУБІПУ, 2009. 127 с.

68. **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Мельничук М.Д., Димань Т.М., Дубін О.В. Методичні рекомендації щодо використання методу полімеразної ланцюгової реакції в скотарстві. Методичні рекомендації. За ред. Т.М. Димань. Біла Церква: Видавництво БНАУ, 2010. 68 с.

69. Мельничук М.Д., Григорюк І.П., Новак Т.В., Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Спиридонов В.Г., Ключащенко АА., Антіпов І.О., Оверченко В.В., **Р.В. Облап**, Н.Б. Новак. Біотехнологія рослин. Практикум. К.: Аграр Медіа Груп, 2011. 215 с.

70. Малієнко В.А., **Облап Р.В.**, Новак Н.Б., Голубець Р.А., Семенович В.К. Динаміка розповсюдження генетично модифікованих організмів у харчових продуктах та сировині. *Производственная лаборатория*. 2012. # 3(42). С. 12–14.

71. Новак Т.В., Балан О.Д., Суліма Н.М., **Облап Р.В.**, Новак Н.Б. Методичні рекомендації впровадження біотехнологічних культур на інноваційних засадах в біоенергетиці. К.: ЦП «Компринт», 2013. 34 с.

72. **Р. В. Облап**, Н. Є. Гриневич, Н. Б. Новак, Т. М. Димань. Методичні рекомендації щодо використання полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі для ідентифікації патогенної мікрофлори у продовольчій сировині і харчових продуктах. Методичні рекомендації. За ред. Т. М. Димань. Біла Церква, 2018. 36 с.

73. Ример В.Д., Семенович В.К., **Облап Р.В.**, Голубець Р.А., Малієнко В.А., Новак Н.Б., Северинов Д.О. Тест-система для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) в харчових продуктах методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ). Патент на корисну модель № 72083. МПК 2012.01, C12N 15/00. Заявник і патентовласник ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ». U2011 15202; заявлено 22. 12. 2011; опубліковано 10. 08. 2012, Бюл. № 15. 4 с.

АНОТАЦІЯ

Облап Р.В. Методологія молекулярно-генетичного оцінювання сільськогосподарської продукції. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика. – Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, с. Чубинське Київської обл., 2021.

Дисертаційну роботу присвячено розробленню методології молекулярно-генетичного оцінювання показників безпечності та якості сільськогосподарської продукції тваринного і рослинного походження за допомогою сучасних методів молекулярно-генетичного аналізу. Запропонована методологія становить сукупність методів, в яких послідовності ДНК як основи спадкового матеріалу живих організмів (вірусів, бактерій, рослин, тварин) використовуються для молекулярно-генетичного маркування ряду ознак, що дають змогу контролювати низку показників безпечності та якості сільськогосподарської продукції.

Для розроблення і валідації методології ідентифікації генотипів тварин, асоційованих з поліпшеними характеристиками якості продукції, було досліджено генетичну структуру двох популяцій ВРХ української чорно-рябої молочної породи за потенційними генами-маркерами молочної продуктивності – к-казеїном (*CSNK*), β-лактоглобуліном (*BLG*) і пролактином (*PRL*). Встановлено взаємозв'язки між виявленими генотипами і комплексами генотипів та основними параметрами молочної продуктивності і технологічними властивостями молока (загальний надій, масова частка жиру і білка, тривалість сичужного зсідання).

Удосконалено методологію ідентифікації небезпечних чинників у харчовій продукції тваринного походження на прикладі діагностики ВЛ ВРХ за використання технології *TaqMan*[®] методу ПЛР у реальному часі. Запропоновано використання молока як альтернативного діагностичного матеріалу.

За використання як молекулярно-генетичних маркерів ділянок генів 16S рРНК та фактору елонгації *Tu* для якісної та кількісної ідентифікації бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus* було розроблено метод визначення

корисної мікрофлори у складі молочної продукції на основі технології *SYBR®Green* методу ПЛР-РЧ.

Розроблено мультиплексну ПЛР-РЧ тест-систему «М'ясо-тест» для одночасної детекції трьох видів м'яса – курятини, свинини та яловичини – з метою виявлення фальсифікації видової належності м'яса у складі харчових продуктів.

Серію мультиплексних ПЛР-РЧ тест-систем було сконструйовано для ідентифікації збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу у сільськогосподарській продукції.

Розроблена мультиплексна тест-система «Глютен-скринінг» уможливорює ідентифікацію у харчовій продукції ДНК злакових культур, глютен у складі яких може спричиняти захворювання на целиацію у людей.

Встановлені особливості поліморфізму структурних елементів генно-інженерних конструктів, використаних для розроблення ГМР, дали змогу розробити і впровадити у виробництво 51 діагностичну тест-систему на основі технології *TaqMan®* ПЛР-РЧ.

Ключові слова: поліморфізм ДНК, молекулярно-генетичні маркери, ПЛР у реальному часі, господарсько-цінні ознаки, безпечність та якість продукції.

АННОТАЦИЯ

Облап Р.В. Методология молекулярно-генетической оценки сельскохозяйственной продукции. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.15 – генетика. – Институт разведения и генетики животных имени М.В. Зубца НААН, с. Чубинское Киевской обл., 2021.

Диссертационная работа посвящена разработке методологии молекулярно-генетической оценки показателей безопасности и качества сельскохозяйственной продукции животного и растительного происхождения с помощью современных методов молекулярно-генетического анализа. Предложенная методология представляет собой совокупность методов, в которых последовательности ДНК как основы наследственного материала живых организмов (вирусов, бактерий, растений, животных) используются для молекулярно-генетического маркирования ряда признаков, обеспечивая тем самым возможность контроля некоторых показателей безопасности и качества сельскохозяйственной продукции.

Для разработки и валидации методологии идентификации генотипов животных, которые ассоциированы с улучшенными характеристиками качества продукции, было исследовано генетическую структуру двух популяций КРС украинской черно-пестрой молочной породы с помощью потенциальных маркерных генов молочной продуктивности – к-казеином (*CSNK*), β-лактоглобулином (*BLG*) и пролактином (*PRL*). Выявлено взаимосвязь между описанными генотипами, комплексами генотипов и основными параметрами молочной продуктивности, а также технологическими свойствами молока (общий надой, содержание % жира и белка, длительность сычужного оседания).

Усовершенствовано методологию идентификации факторов риска в пищевой продукции животного происхождения на примере диагностики ВЛ КРС с помощью

технологии *TaqMan*[®] метода ПЦР в реальном времени. Предложено использование молока в качестве альтернативного диагностического материала.

При использовании в качестве молекулярно-генетических маркеров участков генов 16S рРНК и фактора элонгации Tu для качественной и количественной идентификации бактерий родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Enterococcus* разработан метод определения полезной микрофлоры в составе молочной продукции на основе технологии *SYBR*[®]*Green* метода ПЦР-РВ.

Разработана мультиплексная ПЦР-РВ тест-система «Мясо-тест» для одновременной детекции трех видов мяса – курятины, свинины и говядины – с целью определения фальсификации видовой принадлежности мяса в составе пищевых продуктов.

Серия мультиплексных ПЦР-РВ тест-систем сконструирована для идентификации возбудителей листериоза, сальмонеллеза и шигеллеза в сельскохозяйственной продукции.

Разработанная мультиплексная тест-система «Глютен-скрининг» дает возможность идентифицировать в пищевой продукции ДНК злаковых культур, глютен в составе которых может приводить к заболеванию целиакией у людей.

Установленные особенности полиморфизма структурных элементов генно-инженерных конструкторов, использованных для разработки ГМР, дали возможность разработать и внедрить в производство 51 диагностическую систему, базирующуюся на технологии *TaqMan*[®] ПЦР-РВ.

Ключевые слова: полиморфизм ДНК, молекулярно-генетические маркеры, ПЦР в реальном времени, хозяйственно-ценные признаки, безопасность и качество сельскохозяйственной продукции.

ABSTRACT

Oblap R.V. Methodology of molecular genetic evaluation of food safety and quality. – Manuscript copyright.

Thesis for the Doctor's of Agricultural degree by specialty 03.00.15 "Genetics". – Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Chubynske village, Kyiv Region, 2021.

Research is dedicated to development of methodology of molecular-genetic evaluation of quality and safety of agricultural products of plant and animal origin. Complex research of polymorphism of Quantitative Trait Loci was performed. DNA sequences of animal, plant and microorganisms` genome regions were analyzed. PCR-based diagnostic kits were developed, implemented and offered for use.

Genetic structure of two Black-and White Ukrainian Dairy cattle populations was investigated. Polymorphism of genes κ -casein, β -lactoglobuline and prolactin associated with high productive traits were studied in these two populations (n=451).

The effect of different genetic variants of CSNK, BLG and PRL combination on cheesemaking properties of milk was studied as well.

For the improvement of identification of dangerous infection agents in food of animal origin the comparative diagnostic on BLV was done in cattle by means of Real-Time PCR and RID methods. Conservative region of Env gene which encodes viral

glycoprotein gp51 was used as molecular genetic marker. Efficiency of using milk as alternative bio-material for BLV diagnostics was evaluated. New diagnostic kit was proposed as additive tool for antileukemic measures in farms and for milk testing at milk processing enterprises of Ukraine.

Using molecular genetic markers of 16S rRNA regions and Tu elongation factor genes to identify bacteria of the genera *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* and *Enterococcus* a method based on SYBR®Green technology was developed to determine beneficial microflora in dairy products. Possibility of lactic acid bacteria and bifidobacteria identification in dairy products during the control of the microflora content as well as during the creation of new yeasts, probiotics and probiotic products was proved.

DNA sequences localized within mitochondrial genes of chicken and pork cytochrome b (cytb) and of satellite IV cattle DNA (1.709 satellite IV DNA family) were used as molecular genetic markers for identification of species-specific animal DNA. Real-Time PCR-based methodology of species-specific falsification of chicken, pork and beef meat in food and feed was proposed. Designed kit may be recommended for species-specific meat falsification control.

Real-Time PCR GMO detection methodology has been developed. Methodology proposes 4 stages of GMO control in foodstuff – (1) qualitative analysis (screening), (2) GM lines identification, (3) plant species-specific identification and (4) quantitative analysis. Link of molecular genetic markers has been developed for appropriate kits panel development. Regulator elements (P-35S, T-nos) and «new trait» genes – EPSPS (CP4), Pat, Bar were used as DNA targets for oligonucleotide primers and probes design. Genes of soya lectin, maize alcohol dehydrogenase, rapeseed cruciferin, sugar beet glutamine synthase and rice phospholipase D were used for crops species-specific identification. Primers localized within integrated genetic construct DNA and in plant DNA were designed for GM lines identification. Each kit has been designed as multiplex what enables performing of 2, 3 or even 4 separate reactions simultaneously. One reaction detects domestic endogenous control of PCR run (plant gene), other detects appropriate element of gene construct.

Problem of cereal gluten presence in foodstuff associated with human celiac disease was studied. Molecular genetic markers (ω -gliadins of wheat and rye, B1 hordein of barley, avenin of oat) were determined and appropriate multiplex Real-Time PCR kit was designed. This kit enables identification of even trace amounts of wheat, rye, oat and barley.

Molecular genetic markers (hly, invA, ipaH genes) for listeriosis, salmonellosis and shigellosis pathogens identification were selected. Three appropriate multiplex Real-Time PCR kits for foodstuff examination were developed.

Key words: DNA polymorphism, molecular genetic markers, Real-Time PCR, QTL, food safety and quality.